

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

**«Μελέτη της ανθεκτικότητας της αφίδας *Myzus persicae* στο  
εντομοκτόνο pymetrozine »**

**ΦΩΤΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**Βόλος 2008**

**«Μελέτη της ανθεκτικότητας της αφίδας *Myzus persicae* στο  
εντομοκτόνο pymetrozine »**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**1. Ι. Α. ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ:**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ &  
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**2. Δ. ΣΤΑΜΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ &  
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**3. Ν.Θ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ**

**ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ &  
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στη παρούσα διατριβή μελετάται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας της αφίδας *Myzus persicae* στο αντιτροφικό εντομοκτόνο pymetrozine.

Η διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Στο γενικό μέρος δίνονται πληροφορίες για την ίδια την αφίδα και χαρακτηριστικά του βιολογικού κύκλου της. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά και σχολιάζεται γενικότερα το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα και ειδικότερα δίνονται πληροφορίες για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *Myzus persicae* στις βασικότερες οικογένειες εντομοκτόνων, τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας που έχει αναπτύξει έως τώρα και την τρέχουσα κατάσταση του φαινομένου στην Ευρώπη και την Ελλάδα. Τέλος γίνεται μια αναφορά στα χαρακτηριστικά, τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης της δραστικής ουσίας στην οποία εξετάζεται η πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικότητας από την αφίδα. Στο ειδικό μέρος περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων, εξάγονται συμπεράσματα και γίνεται συζήτηση για την περαιτέρω έρευνα που μπορεί να γίνει μελλοντικά.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στους χώρους του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα διατριβή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή κ Ι.Α.Τσιτσιπή για την πολύτιμη βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθώς και την κατανόηση που επέδειξε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστίες εκφράζονται στους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ι. Μαργαριτόπουλο και Κ. Ζάρπα για τη βοήθειά τους κατά την εκτέλεση του πειράματος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Σκούρα Παναγιώτη για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη σημαντική βοήθεια κατά την εκτέλεση του πειράματος καθώς και τον υποψήφιο Διδάκτορα Βουδούρη Κων/νο και τους μεταπτυχιακούς Μωραΐτη Κλεοπάτρα και Καλογιάννη Νίκο για τις χρήσιμες συμβουλές και τη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και το σύζυγό μου Βρατσίστα Γεώργιο για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1-2
<b>ABSTRACT</b>	3-4
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	5
<b>1. MYZUS PERSICAE – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ</b>	6-23
1.1. Γενικά	6
1.2. Ταξινόμηση και ταξινομικά χαρακτηριστικά	6
1.3. Περιγραφή	8
1.3.1. Στοματικά μόρια και διαδικασία διατροφής	10
1.4. Βιολογικός κύκλος	16
1.5. Επιλογή ξενιστών και προσαρμοστικότητα	20
1.6. Ζημιές	21
<b>2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ</b>	24-49
2.1. Γενικά	24
2.2. Ανάπτυξη και εξέλιξη της ανθεκτικότητας	24
2.3. Τύποι και μηχανισμοί ανθεκτικότητας	26
2.3.1. <i>Ηθολογική ανθεκτικότητα</i>	26
2.3.2. <i>Μειωμένη διείσδυση</i>	26
2.3.3. <i>Μεταβολική ανθεκτικότητα</i>	27
2.3.3.α. Μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450	27
2.3.3.β. Εστεράσες	28
2.3.3.γ. Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες	29
2.3.4. <i>Μείωση της ευαισθησίας του βιοχημικού στόχου</i>	29
2.3.4.α. Κανάλια ιόντων	30
2.3.4.β. Κανάλια Νατρίου	30
2.3.4.γ. Ακετυλοχολινεστεράση	31
2.4. Καταγωγή της ανθεκτικότητας	31
2.5. Προβλήματα που προκύπτουν από την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας	32
2.6. Ανθεκτικότητα της <i>Myzus persicae</i> στα εντομοκτόνα	33
2.6.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της <i>Myzus persicae</i>	33

<b>2.6.1.1. Υπερπαραγωγή καρβοξυλεστερασών</b>	34
<b>2.6.1.2. Μη ευαισθησία ακετυλοχολινεστεράσης στα εντομοκτόνα</b>	37
2.6.1.2.α. Δομή και λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης και δράση των εντομοκτόνων σε αυτή	37
2.6.1.2.β. Μοριακή βάση της μη ευαισθησίας της ακετυλοχολινεστεράσης	39
<b>2.6.1.3. Μη ευαισθησία των καναλιών Νατρίου στα εντομοκτόνα (knock down resistance)</b>	41
2.6.1.3.α. Δομή και λειτουργία των καναλιών Νατρίου και δράση των εντομοκτόνων σε αυτά.	41
2.6.1.3.β. Ρόλος των μεταλλάξεων που προσδίδουν την ανθεκτικότητα	45
2.6.1.3.γ. Συνεισφορά της <i>kdr</i> και των εστερασών στη συνολική ανθεκτικότητα στο DDT και στα πυρεθροειδή	46
<b>2.5. Κόστος στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών εντόμων</b>	47
<b>2.7. Μέθοδοι ανίχνευσης της ανθεκτικότητας</b>	48
<b>2.8. Διαχείριση και αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας</b>	49
<b>2.9. Τρέχουσα κατάσταση της ανθεκτικότητας της <i>Myzus persicae</i> στην Ευρώπη και στην Ελλάδα</b>	49
<b>3. PYMETROZINE</b>	51-56
<b>3.1 Γενικά</b>	51
3.1.1. Φυσικές και χημικές ιδιότητες του pymetrozine	52
3.1.2. Μετακίνηση του pymetrozine στους φυτικούς ιστούς	52
<b>3.2. Τρόπος δράσης του pymetrozine</b>	53
<b>3.3. Χρήση του pymetrozine στην Ελλάδα</b>	55
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	56
<b>4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	58-59
<b>5. ΣΚΟΠΟΣ</b>	60
<b>6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	61-68
<b>6.1. Πειραματικό Υλικό</b>	61
<b>6.2. Μέθοδος δειγματοληψίας και διατήρηση των κλώνων</b>	62
<b>6.3. Εκτροφή των κλώνων</b>	63
<b>6.4. Πειραματική διαδικασία</b>	64
6.4.α. Εύρος δόσεων και παρασκευή διαλυμάτων	64
6.4.β. Διαδικασία Βιοδοκιμής	65

6.4.γ. Μελέτη αναπαραγωγικής ικανότητας	67
<b>6.5. Στατιστική ανάλυση</b>	68
<b>7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	70-85
<b>7.1. Επίδραση του pymetrozine στην επιβίωση</b>	70
7.1.α. Υπολογισμός θνησιμότητας στις 96 ώρες	70
7.1.β. Υπολογισμός θνησιμότητας στις 168 ώρες	73
7.1.γ. Περιοχή δειγματοληψίας και LD <sub>50</sub>	77
7.1.δ. Γεωγραφικό διαμέρισμα Ελλάδας και LD <sub>50</sub>	78
7.1.ε. Ξενιστής και LD <sub>50</sub>	78
7.1.στ. Συντελεστής ανθεκτικότητας (RR)	81
<b>7.2. Επίδραση pymetrozine στον ενδογενή ρυθμό αύξησης του πληθυσμού και στην αναπαραγωγική ικανότητα των αφίδων</b>	83
<b>8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	86-89
8.1. Επίδραση του pymetrozine στην επιβίωση της <i>M. persicae</i>	86
8.2. Επίδραση του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα της <i>M. persicae</i>	87
<b>BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	90-102



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αφίδα *Myzus persicae* είναι ένα κοσμοπολίτικο, παμφάγο είδος το οποίο αποτελεί εχθρό πολλών οικονομικής σημασίας καλλιεργειών ανά τον κόσμο συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Ο σύνθετος βιολογικός κύκλος του εντόμου, με τις δύο εναλλακτικές στρατηγικές αναπαραγωγής και διαχείμασης σε συνδυασμό με την ικανότητα εναλλαγής ξενιστών, εξασφαλίζουν την υψηλή πληθυσμιακή παρουσία του εντόμου για μεγάλη περίοδο του έτους. Παράλληλα, η δράση του ως φορέας εκατοντάδων έμμονων και μη έμμονων ιώσεων μαζί με την άμεση προσβολή των φυτών ξενιστών του έχουν καταστήσει το έντομο για πολλά χρόνια αποδέκτη πολλών στρατηγικών ελέγχου κυρίως όμως μιας πληθώρας χημικών μέσων με αποτέλεσμα να έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στα περισσότερα από αυτά ώστε να θεωρούνται ανεπαρκή και μη αποτελεσματικά για τον έλεγχο του και να διαφαίνεται περισσότερο από ποτέ η ανάγκη επιστράτευσης νέων ουσιών περισσότερο αποτελεσματικών. Το pymetrozine είναι μια νέα δραστική ουσία που δεν ανήκει στις βασικές οικογένειες των εντομοκτόνων αλλά αποτελεί το μοναδικό εκπρόσωπο μιας νέας οικογένειας αντιτροφικών που δεν έχουν αποθητικές ή τοξικές ιδιότητες αλλά επιδρά στην ικανότητα διείσδυσης των στίλετών του εντόμου στο φυτικό ιστό με αποτέλεσμα την παύση της διατροφής και το θάνατο του εντόμου μετά από λίγες μέρες λόγω ασιτίας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη τυχόν ανάπτυξης ανθεκτικότητας του εντόμου στη δραστική ουσία pymetrozine. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η βιοδοκιμή με εμφύσηση φύλλων καπνού σε διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας. Τον πληθυσμό αποτέλεσαν άτομα από 12 κλώνους *M. persicae* που συλλέχθηκαν από δέντρα και φυτά καπνού από περιοχές της Ελλάδας καθώς και από έναν κλώνο που συλλέχθηκε από ζιζάνιο από μια περιοχή της Χιλής. Πιο συγκεκριμένα, για την Ελλάδα συλλέχθηκαν άτομα από δέντρα ροδακινιάς από τις περιοχές Μελίκη, Λεχώνια, Κοζάνη και Ναύπλιο, από φυτά καπνού από τις περιοχές Καρδίτσα, Μελίκη και Κατερίνη. Το εύρος των εφαρμοζόμενων δόσεων ποικίλει ανάλογα με τον κλώνο. Τα άτομα διατηρήθηκαν σε βιοκλιματικούς θαλάμους σε συνθήκες θερμοκρασίας 20°C και φωτοπεριόδου L16:D8. Τον υπό εξέταση πληθυσμό αποτέλεσαν οι απόγονοι των ενηλίκων που αφέθηκαν να γεννήσουν για μια νύχτα σε φύλλα με εντομοκτόνο και απομακρύνθηκαν την επόμενη μέρα που θεωρήθηκε η ημέρα έναρξης της ζωής του

υπο εξέταση πληθυσμού. Έγινε μέτρηση της νυμφικής θνησιμότητας πραγματοποιήθηκε 96 ώρες μετά τη γέννησή τους (απομάκρυνση των ενηλίκων). Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του pymetrozine στην ικανότητα επιβίωσης των ατόμων που επιβίωσαν της μεταχείρισης και για αυτό το λόγο μετρήθηκε η θνησιμότητα των ατόμων που επιβίωσαν τις πρώτες 96 ώρες αφού πρώτα μεταφέρθηκαν σε αμεταχείριστο φύλλο για άλλες 72 ώρες. Τέλος διατηρήθηκαν τρία άτομα από κάθε κλώνο που επιβίωσαν από τη μέση θανατηφόρα συγκέντρωση για να μελετηθεί η επίδραση του pymetrozine στην αναπαραγωγική τους ικανότητα.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι δεν έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα από τα άτομα αυτά της *M. persicae* στο pymetrozine καθώς οι τιμές του συντελεστή ανθεκτικότητας των 13 κλώνων κυμάνθηκαν από 1 έως 3,38. Παράλληλα, η δραστική ουσία αυτή δεν επηρέασε την ικανότητα της περαιτέρω επιβίωσης των ατόμων μετά την επιβίωση από μεταχείριση με τη δραστική ουσία, ενώ σημειώθηκε μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των ατόμων που επιβίωσαν της μέσης θανατηφόρας δόσης.

## ABSTRACT

The aphid *Myzus persicae* is a cosmopolitan and a polyphagous pest for a number of economically important crops around the world, including Greece. Its complex life-cycle with the two alternative reproductive and overwintering strategies in combination with its capability of host alternation secure its high population occurrence throughout the year. Furthermore, the insect's role as a vector of a large number of persistent and non persistent viruses along with the direct feeding damage have exposed *M. persicae* for many years to many control strategies most of them including chemical means. This has resulted to the development of resistance to most of the chemicals used, making them inadequate and ineffective for the insect's control necessitating for the employment of new more effective compounds. Pymetrozine is a new active ingredient that does not belong to the common insecticide groups but is the first and only representative of a new group of antifeedants that has neither repellent nor toxic properties but affects the insect's probing capability resulting to its death after some days due to starvation.

The purpose of the present study was the investigation of resistance development to pymetrozine. The leaf dip bioassay to a range of pymetrozine concentrations was employed. The bioassays were conducted on 13 clones of the aphid. Twelve of them were collected from peach trees and tobacco plants from several parts of Greece and one clone was collected from a weed in Chile. More specifically, half of the clones were collected from peach trees from Meliki, Lehonía, Kozani and Nauplio and the rest were collected from tobacco plants from Karditsa, Meliki and Katerini. The range of pymetrozine concentrations differs among the clones. The aphids were maintained at 20°C at a 16:8 hours light: dark regime. The population of the experiment consisted of the offspring of adults that were kept overnight on treated leaves, under the experiment's conditions in order to produce offspring. Nymph mortality was assessed 96 hours after the removal of adults. The aphids that survived the treatment were placed on untreated leaves under the same conditions for another 72 hours and additional assessments of the nymph mortality established the effect of pymetrozine on the survival of the nymphs. Finally, three nymphs from each clone that survived the LD50 dose were maintained under the same conditions for the assessment of the effect of pymetrozine on their reproductive ability.

The results showed that aphids have not yet developed resistance to pymetrozine since the resistance ratio values ranged between 1 and 3,38. Furthermore, pymetrozine did not effect aphid survival after the first treatment with the active ingredient while there was noted a decline in the reproductive capacity of the aphids that survived the LD50 treatment.

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. MYZUS PERSICAE – ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

### 1.1. Γενικά

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera, Aphididae) είναι ένα κοσμοπολίτικο πολυφάγο είδος ιδιαίτερα μεγάλης εξάπλωσης, με πιθανή καταγωγή την Ασία, όπως ο πρωτεύων ξενιστής της η ροδακινιά.

Ο περίπλοκος και πολυμορφικός βιολογικός κύκλος του εντόμου, που συνδυάζει δυο αναπαραγωγικές στρατηγικές που περιλαμβάνουν μια ετήσια σεξουαλική αναπαραγωγή στον πρωτεύοντα ξενιστή και αλληπάλληλες παρθενογενετικές γενιές στους δευτερεύοντες ξενιστές ευνοεί υψηλούς ρυθμούς πληθυσμιακής αύξησης. Παράλληλα, η εναλλαγή ξενιστών (ετεροουκία) μεταξύ πρωτεύοντος και δευτερεύοντος ξενιστή, αλλά και οι έντονες μετακινήσεις μεταξύ δευτερευόντων ξενιστών στην ίδια καλλιεργητική περίοδο συντελούν στην ευρεία διασπορά του.

Ο πολυμορφισμός που χαρακτηρίζει τις αφίδες γενικότερα αλλά και τη *M. persicae* ειδικότερα χαρακτηρίζει και τη μορφολογία του εντόμου. Έτσι υπάρχουν διαφορετικές μορφές στα διάφορα στάδια του βιολογικού της κύκλου, με τη μεγαλύτερη παραλλακτικότητα στα ενήλικα στάδια, αλλά και στους διάφορους ξενιστές στους οποίους αναπτύσσεται. Πέρα από το γενετικό υπόβαθρο του πολυμορφισμού, ο παράγοντας περιβάλλον επιδρά καθοριστικά στην έκφρασή του.

Παρά την εξειδίκευση που παρουσιάζει η αφίδα στον πρωτεύοντα ξενιστή, όσον αφορά τους δευτερεύοντες ξενιστές, το έντομο χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα πολυφάγο καθώς προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών που ανήκουν σε περισσότερες από 40 οικογένειες, πολλά από τα οποία αποτελούν σημαντικές καλλιέργειες.

Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη δράση της αφίδας ως φορέας έμμονων και μη έμμονων ιών την καθιστά έναν από τους σοβαρότερους εχθρούς σημαντικών ετήσιων καλλιεργειών με αποτέλεσμα το έντομο αυτό να υπόκειται σε συνεχείς επεμβάσεις με εντομοκτόνα για τον έλεγχο και την καταπολέμησή του.

### 1.2. Ταξινόμηση και ταξινομικά χαρακτηριστικά

Υπάρχουν δύο ταξινομικές προσεγγίσεις των αφίδων κατά τις οποίες η *M. persicae* τοποθετείται στο υπογένος *Nectarosiphon* (van Emden et al., 1969), είτε στην οικογένεια Aphididae, της υπεριοικογένειας Aphidoidea (Heie, 1980), είτε στην υποοικογένεια Aphidinae, της οικογένειας Aphididae, της υπεριοικογένειας

Aphidoidea (Remaudiere & Remaudiere, 1997, von Dohlen et al., 2006) της σειράς των στερνόρρυγχων, της υποτάξης των ομόπτερων, της τάξης των ημίπτερων, της υποκλάσης των εξωπτερυγών, της κλάσης Insecta του Ζωικού Βασιλείου.

Η σειρά των στερνορρύγχων χαρακτηρίζεται από τη θέση του ρύγχους (rostrum), που έχει τη βάση του μεταξύ των πρόσθιων ισχύων (fore-coxae) και στη θέση ανάπαυσης τοποθετείται προς τα πίσω κατά μήκος του σώματος. Άλλα χαρακτηριστικά είναι η ύπαρξη καλά αναπτυγμένων κεραιών και ενός ή δύο τμημάτων ταρσών (tarsi).

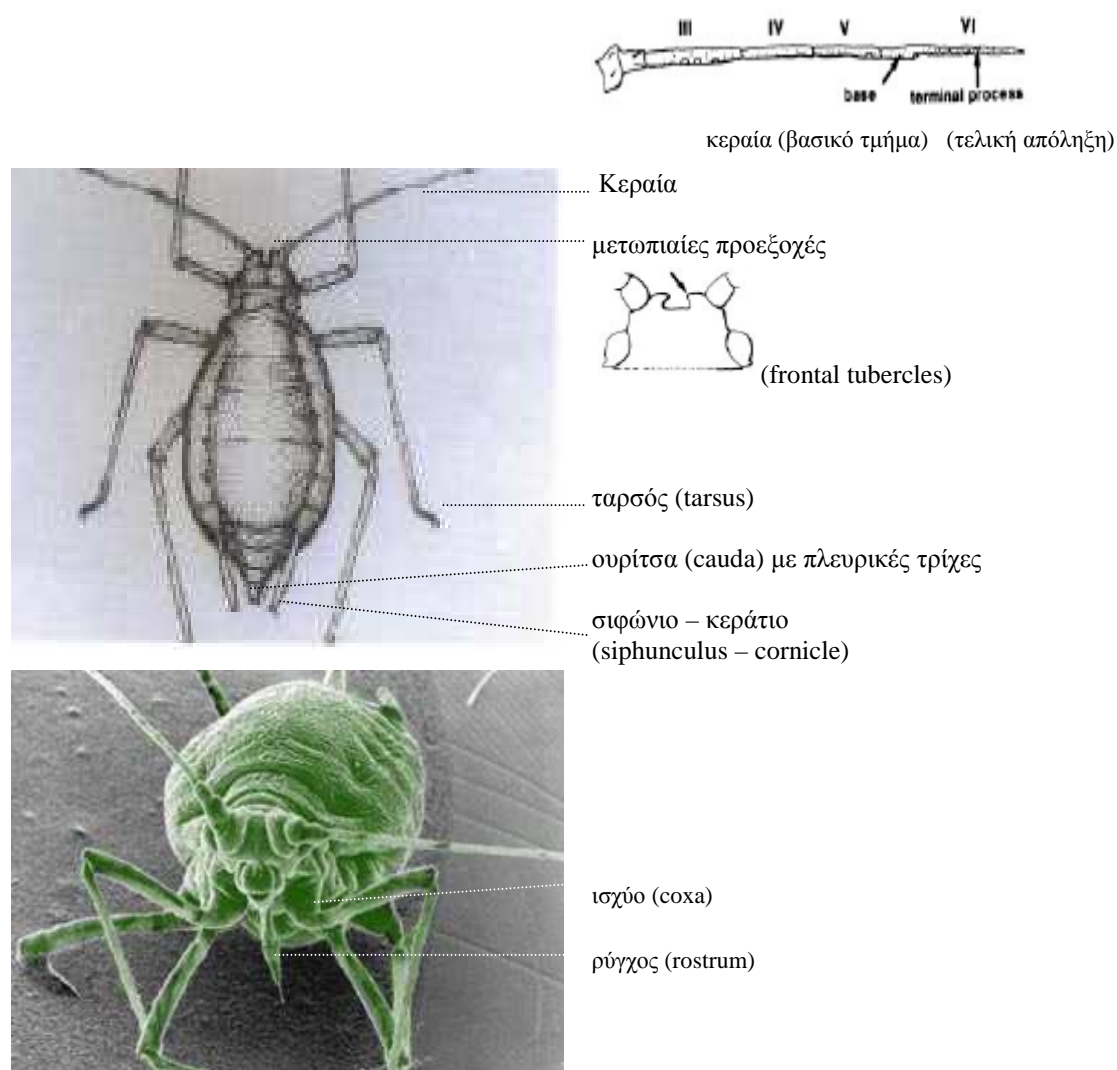
Η οικογένεια Aphididae διακρίνεται από την παρουσία των σιφωνίων (siphunculi) και την ικανότητα ζωοτοκίας. Οι κεραίες των άπτερων έχουν συνήθως 5 ή 6 τμήματα και 2 πρωτεύοντα αισθητήρια όργανα. Το τελευταίο τμήμα έχει μια διακριτή τερματική απόληξη (terminal process). Τα σιφώνια μπορεί να εκλείπουν δευτερευόντως, η ουρίτσα (cauda) είναι αναπτυγμένη (Blackman & Eastop, 1984).

Η υποοικογένεια Aphidinae διακρίνεται για τις μακρές, συνήθως 6 τμημάτων, κεραίες με τερματική απόληξη ποικίλου μεγέθους αλλά σπάνια πολύ κοντή (συνήθως διπλάσια της βάσης του τελευταίου τμήματος). Τα δευτερεύοντα αισθητήρια όργανα στις κεραίες συνήθως είναι κυκλικά. Τα σιφώνια είναι σωληνόμορφα και η cauda έχει γλωσσοειδές σχήμα και μερικές φορές είναι κοντή και πλατιά, ποτέ όμως διογκωμένη. Παρουσιάζουν εναλλαγή ξενιστών μεταξύ δέντρων (πρωτεύων ξενιστής) και ετήσιων καλλιεργειών (δευτερεύων ξενιστής). Είναι ευρέως διεσπαρμένα και κυρίως ολοαρκτικά και ανατολικά (Blackman & Eastop, 1984).

Τα ιδιαίτερα ταξινομικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τη *M. persicae* από τα υπόλοιπα γένη του υπογένους *Nectarosiphon* είναι ότι το τελευταίο τμήμα του ρύγχους (rostrum) έχει μόνο κατ' εξαίρεση 2 ζεύγη πλευρικών τριχών (συνήθως έχει μόνο ένα ζεύγος) με επιπρόσθετα 0 έως 2, σπάνια 3, κάθετες τρίχες και μερικές φορές μια επιπρόσθετη τρίχα πέρα από τα τρία υποκορυφαία ζεύγη. Τα σιφώνια στα άπτερα ζωοτόκα είναι κανονικά ανοιχτόχρωμα με ή χωρίς ένα σκούρο τμήμα στην κορυφή. Πρωτεύοντες ξενιστές είναι είδη του *Prunus spp.* και *Lycium spp.* και δευτερεύοντες μια πληθώρα άλλων ποώδων φυτών (van Emden et al., 1969).

### 1.3.Περιγραφή

Ο βιολογικός κύκλος της αφίδας συνίσταται από δύο κύριες φάσεις: i) τη νυμφική φάση με τα διαφορετικά διακριτά στάδια τα οποία διανύει το έντομο μέχρι να φτάσει την ii) ενήλικη ή αναπαραγωγική φάση, η οποία, ανάλογα με το βιολογικό κύκλο, συνίσταται από τα πτερωτά και άπτερα παρθενογενετικά, τα αρσενικά, τα ωοτόκα και τα θεμελιωτικά.

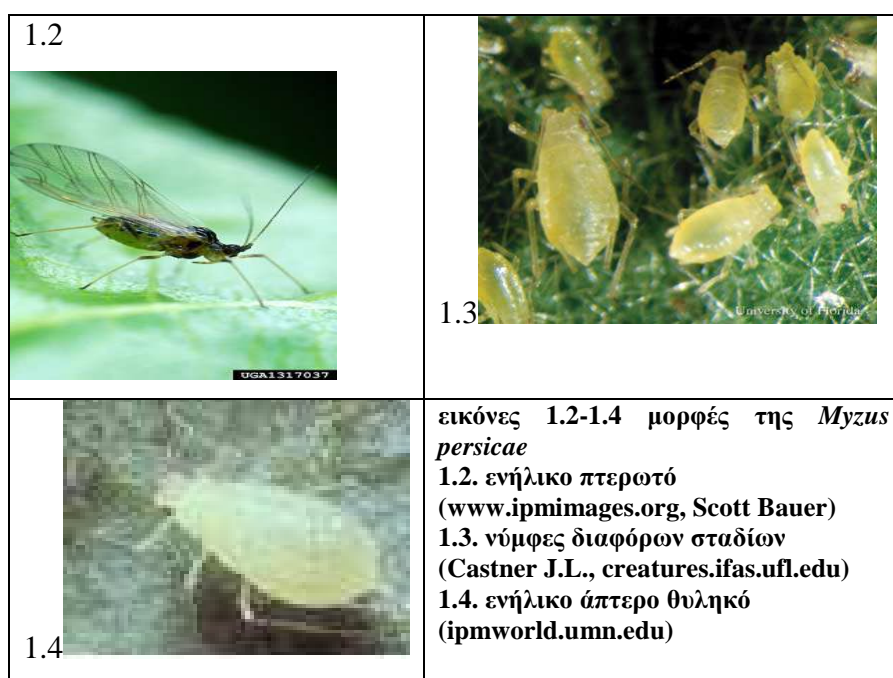


**Εικόνα 1.1:** Όψεις ενήλικου άπτερου θηλυκού της *Myzus persicae* (προσαρμοσμένο από Stoetzel et al., 1996, [www.geocities.jp](http://www.geocities.jp) & [www.mirkazemahedi.blogfa.com](http://www.mirkazemahedi.blogfa.com))

Τα ενήλικα άπτερα θηλυκά είναι μικρά έως μετρίου μεγέθους μήκους 1,9-2,3 mm. Το χρώμα του σώματος είναι ομοιόμορφο, μπορεί να ποικίλει από ανοικτό κίτρινο έως διαβαθμίσεις του πράσινου και του κόκκινου (Blackman & Eastop, 1984). Ο χρωματικός αυτός πολυμορφισμός έχει γενετική βάση όταν πρόκειται για διακλωνικό πολυμορφισμό ενώ όταν παρατηρείται ενδοκλωνικά τότε οφείλεται στην επίδραση διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως θερμοκρασία, θρέψη ή και



φωτοπερίοδος (Van Emden et al., 1969, Kennedy, 1959, Hille Riss Lambers, 1966). Στην Ελλάδα ο χρωματικός πολυμορφισμός συνδέεται με τον ξενιστή και το βιολογικό κύκλο καθώς οι κόκκινοι κλώνοι αποικίζουν καπνό και είναι ανολοκυκλικοί (Margaritopoulos et al., 2002). Το σχήμα του σώματος είναι αχλαδόμορφο (Εικόνα 1.1, 1.4). Οι μετωπιαίες προεξοχές (frontal tubercles) είναι καλά αναπτυγμένες. Οι κεραίες είναι έξι τμημάτων και η τελική απόληξη είναι 3-4 φορές μακρύτερη από τη βάση του 5<sup>ου</sup> τμήματος της κεραίας, ενώ το 3<sup>ο</sup> τμήμα δεν έχει δευτερεύοντα αισθητήρια όργανα. Το κάθε σιφώνιο (cornicle) είναι ελάχιστα διογκωμένο με το μήκος του να είναι 6-8 φορές μεγαλύτερο του πλάτους του, ανοιχτόχρωμο με την κορυφή πιο σκούρα. Η ουρίτσα (cauda) έχει 3 ζεύγη πλευρικών τριχών (setae), είναι ανοιχτόχρωμη έως σκούρα και οι ταρσοί (tarsi) είναι ιδιαίτερα σκούροι (Stoetzel et al., 1996, Devi & Singh, 2007, Blackman & Eastop, 1984).



Τα ενήλικα πτερωτά θηλυκά (Εικόνα 1.2) είναι επίσης μικρού έως μετρίου μεγέθους μήκους 1,8-2,5 mm. Το σχήμα του σώματος είναι επίσης αχλαδόμορφο ενώ το χρώμα ποικίλει από σκούρο πράσινο έως γκριζοπράσινο, μπορεί και σκούρο καφέ, και φέρει μια μεγάλη μαύρη κηλίδα νωτιαία στην κοιλιακή χώρα. Οι μετωπιαίες προεξοχές (frontal tubercles) είναι καλά αναπτυγμένες. Οι κεραίες είναι έξι τμημάτων και η τελική απόληξη είναι 3-4 φορές μακρύτερη από τη βάση του 5<sup>ου</sup> τμήματος της κεραίας, ενώ το 3<sup>ο</sup> τμήμα έχει 8-15 δευτερεύοντα αισθητήρια όργανα ίδιου μεγέθους

και σε κανονική διάταξη. Το 4<sup>ο</sup> τμήμα της κεραίας είναι χωρίς δευτερεύοντα αισθητήρια όργανα. Το κάθε σιφώνιο (cornicle) είναι ελάχιστα διογκωμένο με το μήκος του να είναι 6-8 φορές μεγαλύτερο του πλάτους του, ανοικτόχρωμο με την κορυφή πιο σκούρα. Η ουρίτσα (cauda) έχει τρία ζεύγη πλευρικών τριχών (setae), είναι ανοικτόχρωμη έως σκούρα και οι ταρσοί (tarsi) είναι ιδιαίτερα σκούροι (Stoetzel et al., 1996, Devi & Singh, 2007, Blackman & Eastop, 1984).

Το θεμελιωτικό άτομο είναι άπτερο, έχει μεγαλύτερο και πιο στρογγυλεμένο σώμα με κοντύτερες κεραίες, πόδια και cauda. Τα σιφώνια είναι κοντύτερα και έχουν διαφορετικό σχήμα χωρίς να είναι καθόλου ροπαλοειδή, όπως των άπτερων ή πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών. Πολύ μειωμένες είναι επίσης και οι μετωπιαίες προεξοχές (Blackman & Eastop, 1984).

Τα ενήλικα ωοτόκα θηλυκά είναι συνήθως άπτερα. Μοιάζουν με τα άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά και διακρίνονται από αυτά από την ελάχιστα διογκωμένη κνήμη των πίσω ποδιών που φέρει ρινάρια για την έκκριση της φερομόνης φύλου. Το μέγεθός τους είναι 1,5-2,0 mm και τα χρώμα τους είναι ρόδινο (Blackman & Eastop, 1984).

Τα αρσενικά είναι πτερωτά. Ο εξωτερικός γενετικός οπλισμός είναι έντονα χρωματισμένος και σχετικά μεγάλου μεγέθους. Το σχήμα του σώματος είναι σχεδόν όμοιο με αυτό των πτερωτών ζωοτόκων θηλυκών μόνο που είναι αρκετά μικρότερο και περισσότερο σκουρόχρωμο (Blackman & Eastop, 1984).

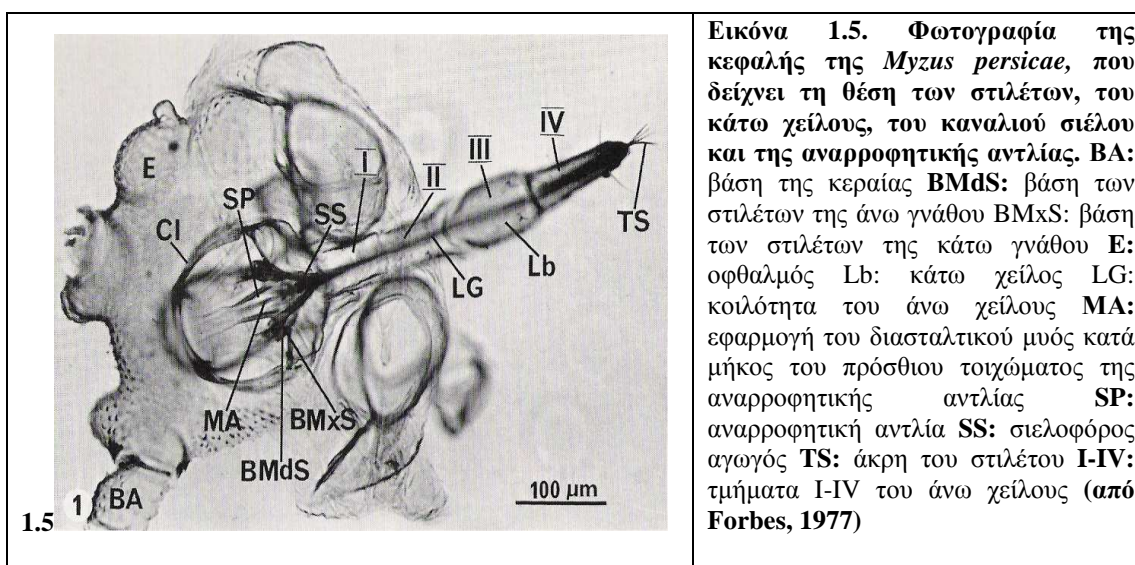
### **1.3.1. Στοματικά μόρια και διαδικασία διατροφής**

Τα στοματικά μόρια της αφίδας αποτελούν το στόχο δράσης ενός νέου εντομοκτόνου του pymetrozine, μοναδικό αντιπρόσωπο της οικογένειας των azomethine pyrimidine. Καθώς η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο pymetrozine αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, είναι χρήσιμη, για την καλύτερη κατανόηση του τρόπου δράσης της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας, η αναλυτικότερη περιγραφή των στοματικών μορίων της αφίδας καθώς και της διαδικασίας διατροφής της.

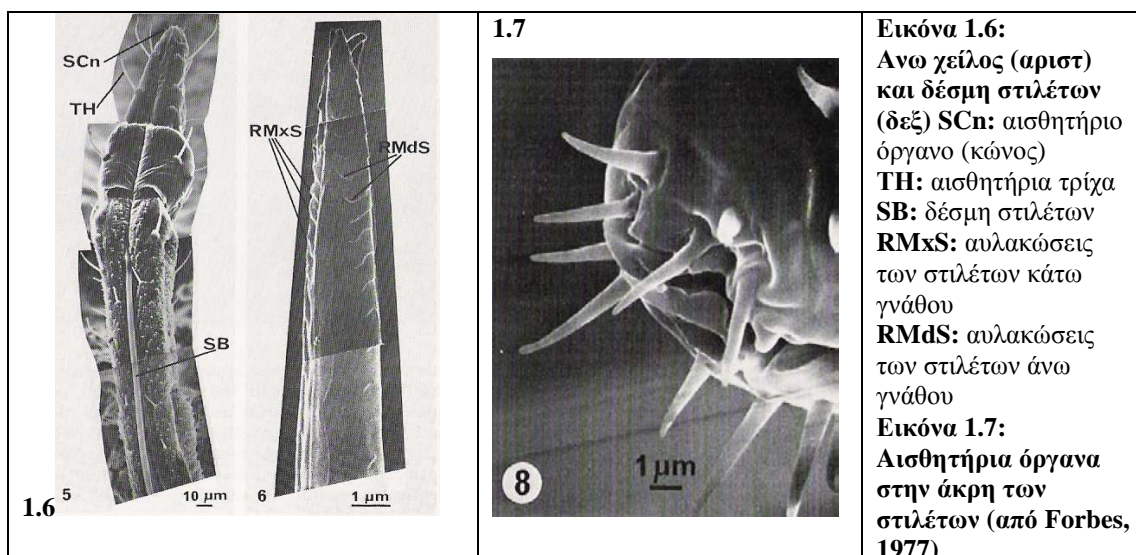
#### *Περιγραφή στοματικών μορίων*

Τα στοματικά μόρια της *M. persicae* είναι άριστα προσαρμοσμένα για τη διάτρηση του φυτικού ιστού και την αναρρόφηση χυμού για διατροφή ενώ παράλληλα αποτελούν μέσα απόκτησης και μετάδοσης των φυτικών ιών.

Τα τμήματα που διεισδύουν στο φυτικό ιστό είναι δύο ζεύγη από λεπτές χιτινικές τριχοειδείς κατασκευές με αιχμηρές κορυφές, τα **στιλέτα**. Το εξωτερικό ζεύγος στιλέτων, τα **στιλέτα της άνω γνάθου**, επεκτείνονται κοντά το ένα με το άλλο μέσα στο κεφάλι, διατρέχουν τη στοματική κοιλότητα και στη συνέχεια ανοίγουν σημαντικά και περιβάλλουν στενά, δημιουργώντας μια θήκη, τις εξωτερικές πλευρές των εσωτερικών στιλέτων, τα στιλέτα της κάτω γνάθου. Στο εσωτερικό κάθε στιλέτου της άνω γνάθου υπάρχει ένας επιμήκης αγωγός (κανάλι) ο οποίος μερικές φορές διακόπτεται, διακλαδίζεται και δεν έχει άνοιγμα στο τερματικό του άκρο. Τα **στιλέτα της κάτω γνάθου** βρίσκονται αμέσως μετά, στο εσωτερικό του κεφαλιού, από τα στιλέτα της άνω γνάθου, με τα οποία μοιάζουν στη γενική μορφή. Συναντώνται στο άκρο του υποφάρυγγα και στο εσωτερικό τους σχηματίζουν δυο επιμήκη κανάλια ή αγωγούς, ένα πρόσθιο **τροφικό αγωγό** και ένα οπίσθιο μικρότερο **σιελοφόρο αγωγό**. Τα στιλέτα της κάτω γνάθου εμπλέκονται μεταξύ τους μέσω συνεφαρμογής κοιλοτήτων και πτυχώσεων ώστε να κρατούνται ενωμένα ενώ την ίδια στιγμή φαίνεται να υπάρχει κάποια ελευθερία σε κάθε δυνατή κίνηση προέκτασης και συστολής με τη βοήθεια μυών προέκτασης και συστολής αντίστοιχα, που υπάρχουν σε κάθε ζεύγος στιλέτων. Ο κεντρικός αγωγός – κανάλι των στιλέτων της άνω γνάθου περιέχει δύο δενδρίτες και τα νεύρα των στιλέτων αυτών είναι μηχανοδεκτικά. Η δέσμη των στιλέτων στη *M. persicae* έχει διάμετρο περίπου 3μ, το τροφικό κανάλι 0,5μ, το σιελοφόρο κανάλι 0,2μ όταν στην κορυφή των στιλέτων είναι αντίστοιχα 0,35μ και 0,07μ. Γενικά, το όργανο διάτρησης της *M. persicae* έχει μήκος 300μ (Auclair, 1963).



**Εικόνα 1.5.** Φωτογραφία της κεφαλής της *Myzus persicae*, που δείχνει τη θέση των στιλέτων, του κάτω χείλους, του καναλιού σιέλου και της αναρροφητικής αντλίας. BA: βάση της κεραίας BMdS: βάση των στιλέτων της άνω γνάθου BMxS: βάση των στιλέτων της κάτω γνάθου E: οφθαλμός Lb: κάτω χείλος LG: κοιλότητα του άνω χείλους MA: εφαρμογή του διασταλτικού μυός κατά μήκος του πρόσθιου τοιχώματος της αναρροφητικής αντλίας SP: αναρροφητική αντλία SS: σιελοφόρος αγωγός TS: άκρη του στιλέτου I-IV: τμήματα I-IV του άνω χείλους (από Forbes, 1977)



Τα τέσσερα στιλέτα στο μέγιστο του μήκος τους εσωκλείονται στο τεσσάρων τμημάτων **κάτω χείλος**, από το οποίο προβάλλουν, όταν εισέρχονται στους φυτικούς ιστούς. Το πρόσθιο άκρο του κάτω χείλους, το οποίο συντίθεται από λεπτή, ευλύγιστη χιτίνη δε σχηματίζει κοιλότητα στον επιμήκη άξονα, κονταίνει από τηλεσκοπική δράση κατά τη διάρκεια της διατροφής. Όταν η αφίδα δεν τρέφεται, τα στιλέτα συνήθως κείτονται στην κοιλότητα του κάτω χείλους συγκρατούμενα στο εσωτερικό αυτής από τον κοντό κλειστό σωλήνα στην κορυφή του πέρα από τον οποίο εκτείνονται ελαφρά μερικές φορές. Το εσωτερικό του κάτω χείλους περιέχει περίπλοκο μυϊκό ιστό. Το άκρο της προβοσκίδας φέρει ένα δακτύλιο από τρίχες, οι οποίες πιθανώς χρησιμεύουν στην καθοδήγηση της αφίδας στην επιλογή ικανού φυτικού μέρους για τη διείσδυση των στιλέτων. Το κάτω χείλος έχει περίπου διάμετρο 50μ (Auclair, 1963). Όλα τα τμήματα του κάτω χείλους έχουν τρίχες αφής και η ακραία κορυφή του 4<sup>ου</sup> τμήματος φέρει οκτώ ζεύγη από αισθητήριους κόνους που περιβάλλουν το άνοιγμα από το οποίο προβάλλουν τα στιλέτα. Κάθε κόνος διατρέχεται από νεύρα και είναι κυρίως μηχανοδεκτικά όργανα. Το **άνω χείλος** δεν είναι τόσο εμφανές όσο το κάτω χείλος. Είναι κοντό και τριγωνικό και καλύπτει τη βάση του κάτω χείλους και της δέσμης των στιλέτων. Η εσωτερική επιφάνεια έχει μια επιμήκη κοιλότητα, η οποία τοποθετεί και οδηγεί τη δέσμη των στιλέτων όσο αυτή απομακρύνεται από το κεφάλι (Forbes, 1977).

Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και η (**cibarial**) **φαρυγγική τροφική αντλία** στο εσωτερικό της κεφαλής, η οποία συνεισφέρει με τη μυϊκή δράση στο πέρασμα του φυτικού χυμού από τον τροφικό αγωγό μέσω του υποφάρυγγα στον οισοφάγο (Auclair, 1963). Σε εγκάρσια τομή έχει σχήμα ημισελήνου με ένα παχύ τοίχωμα και

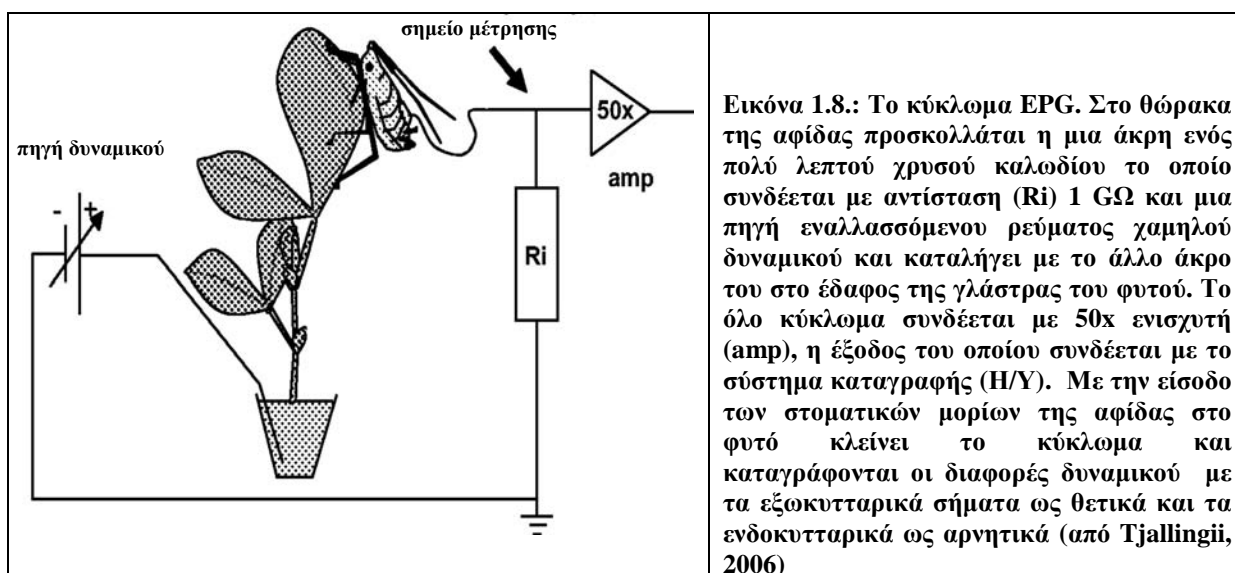
ένα λεπτότερο πρόσθιο τοίχωμα που εγκολπώνεται μέσα στην κοιλότητα. Επενδύεται εσωτερικά από μακριούς διασταλτικούς μύες οι οποίοι διατρέχονται από ένα νεύρο κίνησης που προέρχεται από το νεύρο του κάτω χείλους (Forbes, 1977). Δίπλα και σε επαφή με τη αναρροφητική (cibarial) αντλία υπάρχει το **επιφαρυγγικό αισθητήριο όργανο της γεύσης** το οποίο αποτελείται από 14 αισθητήρια όργανα (porous papillae), που διαπερνώνται από 60 νεύρα και αποτελεί ένα χημειοδέκτη επαφής. Ένα νεύρο περνά από κάθε ζεύγος αισθητήριων οργάνων (papillae) πάνω σε κάθε πλευρά των διασταλτικών μυών της αναρροφητικής (cibarial) αντλίας προς τον εγκέφαλο.

#### *Σύντομη περιγραφή της διαδικασίας διατροφής της αφίδας*

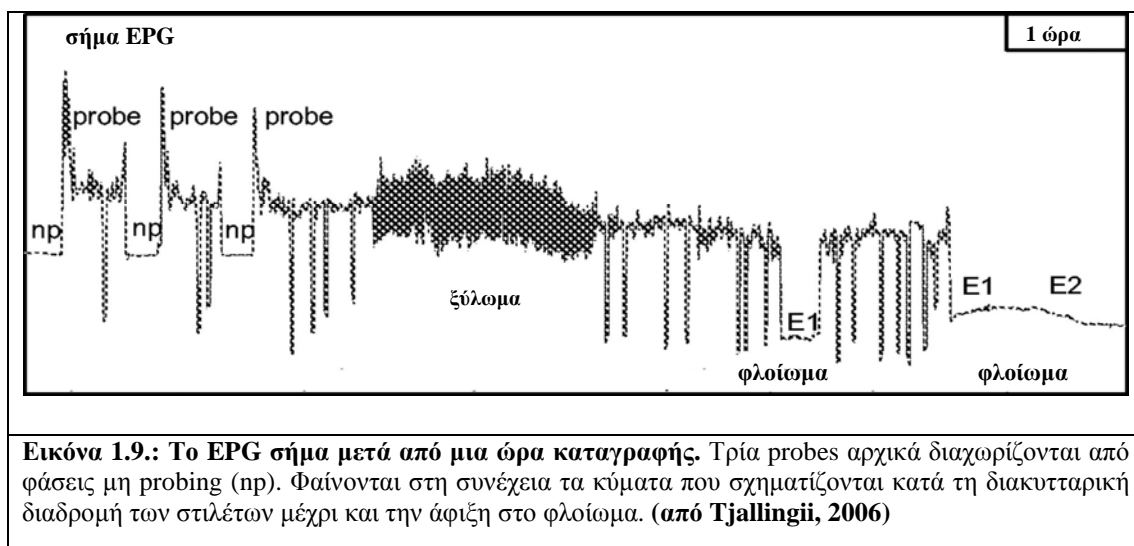
Αφού η αφίδα εγκατασταθεί στη θέση διατροφής αρχίζει να συλλέγει πληροφορίες μέσω διάφορων φυσικών και χημικών ερεθισμάτων για την καταλληλότητα της τροφής. Πριν την είσοδο των στιλέτων στον ιστό εκκρίνει μια σταγόνα σιέλου στη φυτική επιφάνεια, η οποία διαλύει κάποια συστατικά από την κουτίκουλα ώστε οι χημειοδέκτες στην άκρη του κάτω χείλους, οι οποίοι εμβαπτίζονται στη σιέλο να μπορούν να δώσουν περαιτέρω πληροφορίες για την καταλληλότητα του υποστρώματος (Srivastava, 1987). Εάν οι πληροφορίες οδηγούν στην αποδοχή του υποστρώματος ξεκινά η διαδικασία διείσδυσης των στιλέτων στο φυτικό ιστό. Υπό την επίδραση των μυών προέκτασης και συστολής, που εφαρμόζονται στη βάση των στιλέτων και με τη βοήθεια της δράσης σύσφιξης του κάτω χείλους, που συγκρατεί ενωμένα τα στιλέτα εκτελούνται διαδοχικές κινήσεις διείσδυσης με τα στιλέτα της άνω γνάθου να κινούνται παλμικά στον επιμήκη άξονα «ανοίγοντας το δρόμο» μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων ακολουθώντας το αποπλαστικό μονοπάτι (διακυτταρικά) και τα στιλέτα της κάτω γνάθου να κινούνται πάνω-κάτω ταυτόχρονα ή να ολισθαίνουν το κάθε ένα στίλετο προς το άλλο (Forbes, 1977) διατρύπώντας την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων διεισδύοντας σε αυτά επιτρέποντας διάτρηση του συμπλάστη. Οι πρώτες διεισδύσεις στην επιδερμίδα του φυτού ξενιστή είναι σύντομες (<1min) και έχουν ανιχνευτικό χαρακτήρα με την κατάποση μικρής ποσότητας χυμού και την επαφή του με το επιφαρυγγικό γευστικό όργανο. Η δραστηριότητα των στιλέτων συνεχίζεται πέρα από την επιδερμίδα και διαπερνάται το μεσόφυλλο και το παρέγχυμα πάλι με καταπόσεις φυτικού χυμού για γευστική διάκριση. Η διείσδυση των στιλέτων στο φλοίωμα αρχικά ακολουθείται από έκκριση υδατικής σιέλου για την παρεμπόδιση των αμυντικών μηχανισμών του φυτού και την εξαγωγή του φυτικού χυμού. Περίοδοι επαφής με το φλοίωμα πάνω από 10

λεπτά σημαίνει την αποδοχή του φλοιώματος και η διαδικασία κατάποσης του φυτικού χυμού μπορεί να διαρκέσει και ώρες. Η διείσδυση στον αποπλάστη υποβοηθείται από την έκκριση πρωτεϊνικής σιέλου από τις άκρες των στυλέτων που στερεοποιείται σχηματίζοντας μια υποστηρικτική θήκη και η οποία παραμένει και μετά την απομάκρυνση των στυλέτων ενώ η διάτρηση του συμπλάστη ακολουθείται από ταχεία αλλαγή στην έκκριση υδατικής σιέλου η οποία εισέρχεται στο κύτταρο όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η κατάποση του φυτικού χυμού πραγματοποιείται με τη βοήθεια της (cibarial) βαλβίδας της αναρροφητικής αντλίας, η οποία με τη συστολή των διασταλτικών μυών της αυξάνει το μέγεθος της κοιλότητάς της καθώς τραβιέται το εγκολπωμένο εσωτερικό τοίχωμα δημιουργώντας μειωμένη πίεση στο θάλαμο αναρροφώντας έτσι το φυτικό χυμό μέσα στο θάλαμο ενώ με τη χαλάρωση των διασταλτικών μυών το τοίχωμα μαζεύεται πίσω διώχνοντας το χυμό στο πρόσθιο έντερο (Forbes, 1977, Powell et al., 2006).

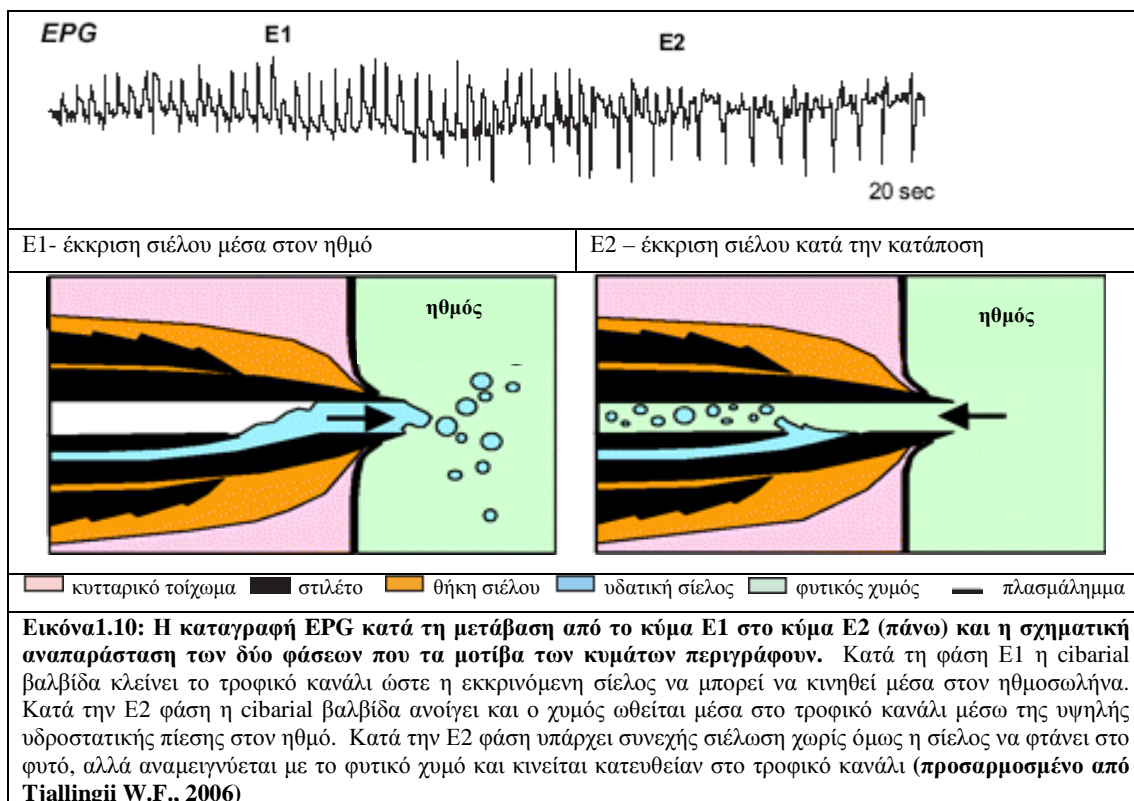
Με την τεχνική της ηλεκτρικής καταγραφής της διείσδυσης (EPG technique) το έντομο και το φυτό μπορούν να αποτελούν μέρος ενός ηλεκτρικού κυκλώματος με τη βοήθεια του οποίου καταγράφονται οι διαφορές δυναμικού που σημειώνονται κατά τη διαδικασία διατροφής του εντόμου πάνω στο φυτό (βλ Εικόνα 1.8.-1.9.). Έτσι η όλη διαδικασία διατροφής της αφίδας μπορεί να μελετηθεί διεξοδικότερα μέσω της ανάλυσης των σημάτων που καταγράφονται.







Με τη βοήθεια της μεθόδου αυτής η παραπάνω διαδικασία έχει καταγραφεί και το τελικό σήμα αποτελείται από κύματα συγκεκριμένων μοτίβων. Από την πρώτη διείσδυση των στίλετών μέχρι την προσέγγιση του φλοιώματος παρατηρούνται κυκλικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα κυμάτων A, B, C καθώς και πτώσεις δυναμικού (potential drop – pd) σε κάθε σύντομη (5-10sec) διείσδυση. Μετά την άφιξη των στίλετών στο φλοιώμα, κατά τη φάση έκκρισης υδατικής σιέλου, σημειώνονται τα κύματα μοτίβου E1, ενώ η ακόλουθη κατάποση του φυτικού χυμού καταγράφεται ως κύματα μοτίβου E2 (βλ. Εικόνα 1.10) (Tjallingii, 2006).



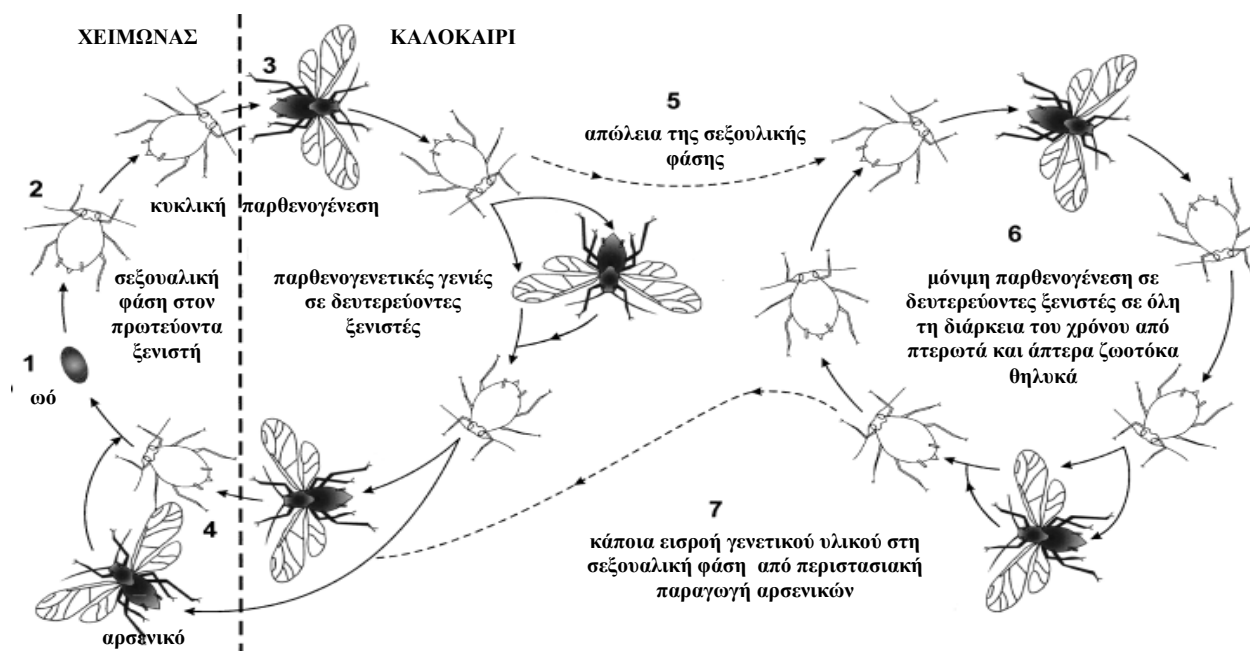
#### 1.4.Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος της *M. persicae*, όπως και των περισσότερων ειδών αφίδων παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία ως αντίδραση στη συνδυασμένη επίδραση του περιβάλλοντος και του γονοτύπου. Παρατηρούνται τέσσερις τύποι, ο **ολοκυκλικός**, που σημειώνεται συνήθως στις εύκρατες περιοχές κάθε ηπείρου και κατά τον οποίο μια σειρά θηλυκών παρθενογενετικών γενιών την άνοιξη και το καλοκαίρι ακολουθείται από μια ετήσια σεξουαλική γενιά με την παραγωγή σεξουαλικών μορφών τα τέλη καλοκαιριού ή το φθινόπωρο, που οδηγεί στην παραγωγή ωών τα οποία είναι και η διαχειμάζουσα μορφή. Ο **ανολοκυκλικός**, που σημειώνεται συνήθως στις περιοχές του τροπικού αλλά και στα θερμοκήπια, κατά τον οποίο παρατηρείται συνεχόμενη παρθενογένεση όλο το χρόνο. Ο **ανδροκυκλικός**, που από τις σεξουαλικές μορφές είναι δυνατή η παραγωγή μόνο αρσενικών ατόμων και ο **ενδιάμεσος**, κατά τον οποίο παρατηρείται ολοκυκλικότητα ή ανολοκυκλικότητα ή συνδυασμός και των δύο τύπων βιολογικών κύκλων ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που συναντούν τα άτομα στις διάφορες περιοχές.

Στην περίπτωση του ολοκυκλικού βιολογικού κύκλου το φθινόπωρο στις εύκρατες περιοχές πτερωτά μεταναστευτικά θηλυτόκα φτάνουν στον πρωτεύοντα ξενιστή (γένη του *Prunus spp.*), τον οποίο και αποικίζουν εφόσον συμπέσουν ο χρόνος μετανάστευσης με την έναρξη της γήρανσης των φύλλων. Τα θηλυτόκα μετά την εγκατάστασή τους αρχίζουν να γενούν τα ωοτόκα, τα οποία θα συνευρεθούν με τα αρσενικά, τα οποία προσελκύουν με τις σεξουαλικές φερομόνες που εκλύουν. Όσα από τα ωοτόκα προλάβουν να ωριμάσουν μέχρι το λήθαργο του δένδρου, που είναι απαγορευτικός για την ανάπτυξη και διατροφή τους θα εναποθέσουν τα 4-13 αυγά τους, συνήθως στις πτυχώσεις γύρω και μέσα στους μασχαλιαίους οφθαλμούς. Τα αυγά θα διαχειμάσουν σε διάπαυση, κατά τη διάρκεια της οποίας δεν εκκολάπτονται σε θερμοκρασία δωματίου, και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στο ψύχος. Η εξέλιξη της διάπαυσης εξαρτάται από τις χαμηλές θερμοκρασίες και ολοκληρώνεται μέσα στο χειμώνα. Η εκκόλαψη των ωών συμπίπτει με βλαστητική φαινολογία και τα νεοεκκολαπτόμενα θεμελιωτικά τρέφονται στους οφθαλμούς του πρωτεύοντα ξενιστή. Τα θεμελιωτικά αναπτύσσονται πολύ γρήγορα στους 11°C που μπορεί να θεωρηθεί και ως το κατώτερο όριο ανάπτυξης και παράγουν περίπου 50-60 νεαρά, τα οποία τρέφονται στους εκπτυσσόμενους οφθαλμούς, τα άνθη, τα φύλλα και τους μαλακούς βλαστούς του πρωτεύοντα ξενιστή και μόνο καθώς παρουσιάζουν μεγάλη



εξειδίκευση στις τροφικές τους απαιτήσεις εκείνη την περίοδο (van Emden et al., 1969).



**Εικόνα 1.11: Ο πολυμορφισμός στο βιολογικό κύκλο μιας ετερόοικης αφίδας.** Σε περιοχές με κρύο χειμώνα παρατηρείται φθινοπωρινή μετανάστευση στον πρωτεύοντα ξενιστή, όπου οι σεξουαλικές μορφές συζεύγνυνται και παράγουν τα διαχειμάζοντα ωά (1). Από αυτά θα προέλθει το θεμελιωτικό (2), το οποίο δίνει τις επόμενες διαδοχικές παρθενογενετικές γενιές ζωοτόκων πτερωτών ή άπτερων θηλυκών την άνοιξη και το καλοκαίρι, εκ των οποίων η πρώτη πτερωτή γενιά (3) μεταναστεύει στους δευτερεύοντες ποώδεις ξενιστές. Το φθινόπωρο (4), υπό την επίδραση χαμηλής φωτοπερίοδου και θερμοκρασίας, παράγονται πτερωτά, που μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή και ολοκληρώνοντας τον ολοκυκλικό βιολογικό κύκλο. Σε περιοχές με ζεστό καιρό το κομμάτι της εγγενούς αναπαραγωγής έχει χαθεί ή παρεμποδίζεται (5) και παρατηρούνται παρθενογενετικές γενιές όλο το χρόνο. Δεν παράγονται έμφυλες μορφές (6) αλλά μπορεί να παραχθούν αρσενικά, τα οποία με σύζευξη με ολοκυκλικά θηλυκά μπορούν να συνεισφέρουν στη γενετική σύνδεση μεταξύ των πληθυσμών (προσαρμοσμένο από Field & Blackman, 2003)

Ακολουθούν γύρω στις οκτώ άπτερες παρθενογενετικές γενιές και όσο πλησιάζει το καλοκαίρι παρατηρείται μια όλο και αυξανόμενη πτωτική τάση στην αναπαραγωγή των αφίδων λόγω του συνωστισμού που αναπτύσσεται και της φθίνουσας θρεπτικής κατάστασης του πρωτεύοντα ξενιστή. Μεγάλο τμήμα των ατόμων γίνονται πτερωτά τα οποία μεταναστεύουν στους δευτερεύοντες ξενιστές όπου παράγουν αρκετούς απογόνους μέχρι να χάσουν την πτητική τους ικανότητα. Στους δευτερεύοντες ξενιστές, που συνήθως είναι ποώδη φυτά, ακολουθούν αλληπαλλήλες παρθενογενετικές γενιές μέχρι το φθινόπωρο οπότε με την επίδραση της μικρότερης διάρκειας μέρας παράγονται τα πτερωτά θηλυτόκα και τα αρσενικά, που θα μεταναστεύσουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Τα άπτερα άτομα σε συνθήκες εργαστηρίου μπορούν να παράγουν από 30 έως και 80 απογόνους ενώ τα πτερωτά συνήθως παράγουν περίπου 20 απογόνους. Σε πραγματικές συνθήκες αγρού σπάνια

ανέρχονται οι απόγονοι σε τέτοια νούμερα καθώς παράγοντες, όπως κλιματικές συνθήκες ή και ποιότητα τροφής επηρεάζουν τη γονιμότητα (van Emden et al., 1969).

Κατά τον ανολοκυκλικό βιολογικό κύκλο τα άτομα της *M. persicae* διαχειμάζουν στα ενεργά στάδια σε περιοχές με ζεστούς και ήπιους χειμώνες. Οι πληθυσμοί αυτοί αναπτύσσονται σε δευτερεύοντες ξενιστές χωρίς να απαιτείται η μετανάστευσή τους στον κύριο ξενιστή για να ωτοκήσουν. Παράγονται αλληπάλληλες παρθενογενετικές γενιές στα ποώδη φυτά, που είναι διαθέσιμα όλο το χρόνο. Παρατηρούνται επομένως μικρότερες απώλειες στον πληθυσμό καθώς εξαλείφονται οι κίνδυνοι από τις φθινοπωρινές πτήσεις προς τον πρωτεύοντα ξενιστή για σύζευξη και ωτοκία και επίσης τα διαχειμάζοντα ενεργά στάδια έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης αργά την άνοιξη σε σύγκριση με τους εκκολαπτόμενους πληθυσμούς, που είναι περισσότερο ευάλωτοι στους φυσικούς εχθρούς εκείνη την περίοδο. Τα εξελικτικά πλεονεκτήματα έχουν καταστήσει την υποχρεωτική παρθενογένεση τη μοναδική στρατηγική αναπαραγωγής σε πολλές περιοχές του πλανήτη και έχει ενισχυθεί ιδιαίτερα από τις γεωργικές πρακτικές που παρέχουν θρεπτικούς ξενιστές όλο το χρόνο. Στις πολύ ζεστές και υγρές περιοχές του τροπικού όμως, οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες καθιστούν σχεδόν αδύνατη την επιβίωση του εντόμου καθώς το μέγιστο ανάπτυξης θεωρούνται οι 28 °C ενώ στους 32°C παρατηρείται εξαφάνιση του πληθυσμού, ο οποίος ανανεώνεται από την εποίκιση ατόμων από ψυχρότερες περιοχές (van Emden et al., 1969).

Η παραλλακτικότητα στο βιολογικό κύκλο της αφίδας που παρατηρείται σε όλο τον πλανήτη είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης του περιβάλλοντος ως κλιματική επίδραση και του γονότυπου καθώς στους διάφορους πληθυσμούς της *M. persicae* υπάρχουν γονότυποι, οι οποίοι είναι ικανοί να παράγουν ωτόκα και αρσενικά (ολοκυκλικά), άλλοι που μπορούν να παράγουν μόνο αρσενικά (ανδροκυκλικά) και άλλοι που έχουν χάσει την ικανότητα να παράγουν σεξουαλικές μορφές (ανολοκυκλικά). Οι μορφές που μπορούν να παράγουν σεξουαλικές μορφές είναι σε θέση να το κάνουν μόνο υπό την επίδραση της εναλλαγής φωτεινών και σκοτεινών περιόδων με πιο σημαντική την επίδραση της σκοτεινής περιόδου, η οποία πρέπει να υπερβεί ένα συγκεκριμένο κρίσιμο μήκος (Blackman, 1974) και η διαφοροποίηση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πραγματοποιείται υπό την επίδραση ελαφρώς διαφορετικών συνθηκών (Bonnemaïson, 1951).

Στην περίπτωση του ανολοκυκλικού βιολογικού κύκλου η γενετική ικανότητα για παραγωγή σεξουαλικών μορφών δεν έχει χαθεί πλήρως, όπως στην περίπτωση της

υποχρεωτικής παρθενογένεσης, παρόλο που δεν εκφράζεται. Η ανολοκυκλικότητα των αφίδων προκύπτει από την αποτυχία των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων να μετατρέψουν την παρθενογένεση σε σεξουαλική αναπαραγωγή (Blackman, 1974) παρόλο που στην Ελλάδα οι συχνότητες των διαφορετικών γονοτύπων φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από την αφθονία ή μη του πρωτεύοντα ξενιστή και δευτερευόντως από τη θερμοκρασία του χειμώνα σε τοπικό επίπεδο (Margaritopoulos et al., 2002) παρατήρηση που σημειώθηκε και σε κλώνους από άλλα σημεία στην Ευρώπη, όπου οι ανολοκυκλικοί κλώνοι ήταν συχνοί απουσία του πρωτεύοντα ξενιστή και ικανοί να αντεπεξέλθουν τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα (Kerhalogianni et al., 2002). Έτσι, σε τοπικό επίπεδο ολοκυκλικούς κλώνους συναντάμε από τη Βόρεια Ελλάδα κυρίως στην κεντρική Μακεδονία, όπου είναι η κύρια περιοχή καλλιέργειας ροδάκινου και όχι για παράδειγμα στη Θράκη, που είναι μεν βόρεια αλλά οι καλλιέργειες ροδάκινου δεν είναι συχνές. Στην κεντρική και νότια Ελλάδα, όπου οι καλλιέργειες ροδάκινου σπανίζουν, η παρουσία των ολοκυκλικών κλώνων μειώνεται ιδιαίτερα. Παράλληλα παρατηρήθηκε σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας σημαντική παρουσία των ανδροκυκλικών γονοτύπων, κάτι που υπογραμμίζει τη σύνδεση που υπάρχει μεταξύ ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών πληθυσμών καθώς τα αρσενικά που παράγονται στους ανολοκυκλικούς πληθυσμούς μπορούν να συνεισφέρουν στη ροή γονιδίων των ολοκυκλικών πληθυσμών (Margaritopoulos et al., 2002, Blackman et al., 2007).

Οι δύο διαφορετικές στρατηγικές διαχείμασης επιδρούν διαφορετικά στη γενετική σύσταση ενός πληθυσμού καθώς η ολοκυκλικότητα με την ετήσια σεξουαλική φάση εμπεριέχει το γενετικό ανασυνδυασμό ανάμεσα σε διαφορετικούς γονοτύπους ενώ η παρθενογενετική αναπαραγωγή του ανολοκυκλικού βιολογικού κύκλου συνδέεται με τη διατήρηση των γονοτύπων. Επομένως, η αξία της γνώσης του βιολογικού κύκλου της *M. persicae* δεν περιορίζεται μόνο στην προφανή αξιοποίησή της στο σχεδιασμό προγραμμάτων ελέγχου του εντόμου ή στην κατανόηση της επιδημιολογίας των μεταφερόμενων από την αφίδα ιών μέσω της μεταναστευτικής τους ιδιότητας ή μη του εντόμου, αλλά συνδέεται και με την επίδραση των διαφορετικών γονοτύπων στην απόκτηση, διάδοση και διατήρηση των μεταλλάξεων που προσδίδουν την ανθεκτικότητα στα διάφορα εντομοκτόνα σε κάθε πληθυσμό.

### 1.5.Επιλογή ξενιστών και προσαρμοστικότητα

Η *M. persicae* επιδεικνύει μια εξειδίκευση ως προς τον πρωτεύοντα ξενιστή χρησιμοποιώντας κυρίως τη ροδακινιά και κάποια στενά συσχετιζόμενα γένη, όπου πραγματοποιεί και τη σεξουαλική της αναπαραγωγή ενώ ως δευτερεύοντες ξενιστές χρησιμοποιεί παραπάνω από 400 φυτικά είδη από πάνω από 40 οικογένειες (van Emden, 1969), όπου βιώνουν οι παρθενογενετικές γενιές με αποτέλεσμα να θεωρείται ένα ιδιαίτερα πολυφάγο είδος.

Όπως και στα υπόλοιπα είδη αφίδων η επιλογή του ξενιστή ως διαδικασία μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερα διαδοχικά βήματα: 1) την προ-προσγείωσης συμπεριφορά, 2) την εξερεύνηση της φυλλικής επιφάνειας και τη σύντομη διείσδυση (probing) των υποεπιδερμικών ιστών, 3) τη βαθύτερη σύντομη διείσδυση (probing) των φυτικών ιστών και 4) την αξιολόγηση του φυτικού χυμού.

Κατά την επιλογή ενός φυτού ξενιστή η *M. persicae* υπόκειται όπως τα περισσότερα έντομα στη θεωρία των Kennedy & Booth της δυαδικής διάκρισης κατά την οποία εμπλέκονται αντιδράσεις σε ουσίες θρεπτικής αξίας (ή οπτικές αποδείξεις αυτών) και σε δευτερεύουσες ουσίες καμίας θρεπτικής αξίας, που στην περίπτωση της *M. persicae* οι τελευταίες έχουν μεγαλύτερη σημασία στη μη αποδοχή (van Emden, 1969, Kennedy & Booth, 1951). Σημασία στην επιλογή έχει επίσης και η κατάσταση της φυσιολογίας του φυτού καθώς τα αφιχθέντα πετρωτά επιλέγουν φυτά σε συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης και φύλλα μιας χαρακτηριστικής για το είδος ηλικίας αποφεύγοντας ώριμα φύλλα που είναι φυσιολογικά ενεργά σε όρους ανάπτυξης και γήρανσης (van Emden, 1969, Kennedy, 1958). Παρά την εξειδίκευση που επιδεικνύει λοιπόν η αφίδα στον πρωτεύοντα ξενιστή, στους δευτερεύοντες ξενιστές ανήκουν φυτά από μια πληθώρα οικογενειών καθώς το έντομο δεν επιλέγει τόσο με βάση την ταξινομική θέση του φυτού όσο με βάση τη φυσιολογία του (van Emden, 1969). Ανάμεσα στους δευτερεύοντες ξενιστές του συναντώνται και φυτά των οικογενειών Asteraceae, Chenopodiaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cruciferae, Malvaceae, Solanaceae προσβάλλοντας σημαντικές καλλιέργειες, όπως καπνός, τομάτα, πατάτα, λάχανο, σπανάκι κ.α. Η προσαρμογή των ατόμων της *M. persicae* στους διάφορους ξενιστές παρουσιάζει έντονη παραλλακτικότητα (Weber, 1985, 1986, Troncoso et al., 2005) με αντίστοιχες διαφοροποιήσεις και στην επίδοση σε κάθε ξενιστή επιδεικνύοντας την καλύτερη επίδοση στο φυτό από το οποίο προήλθε (Weber, 1985, 1986, Nikolakakis et al., 2003, Vargas et al., 2005). Χαρακτηριστικότερη είναι η περίπτωση του υποείδους *M. persicae* ssp. *nicotianae*

το οποίο παρουσιάζει εξειδίκευση στο φυτό του καπνού, που συνοδεύεται με μορφολογική και ηθολογική διαφοροποίηση γενετικής βάσης (Margaritopoulos, 2000) και στο οποίο η προσαρμογή του στο φυτό του καπνού συνδέεται με ‘ανταλλαγές’ που μειώνουν την επίδοσή του σε άλλα είδη ξενιστών (Nikolakakis, N.N., 2003, Vargas et al., 2005). Σε πειράματα που έγιναν σε κλώνους αφίδων *M. persicae* σε διάφορες ποικιλίες καπνού παρατηρήθηκε επίσης μια σύνδεση της απόδοσης των πληθυσμών με το χρώμα τους με τα κόκκινα άτομα να επιδεικνύουν καλύτερη προσαρμογή από τα πράσινα (Goundoudaki et al., 2003).

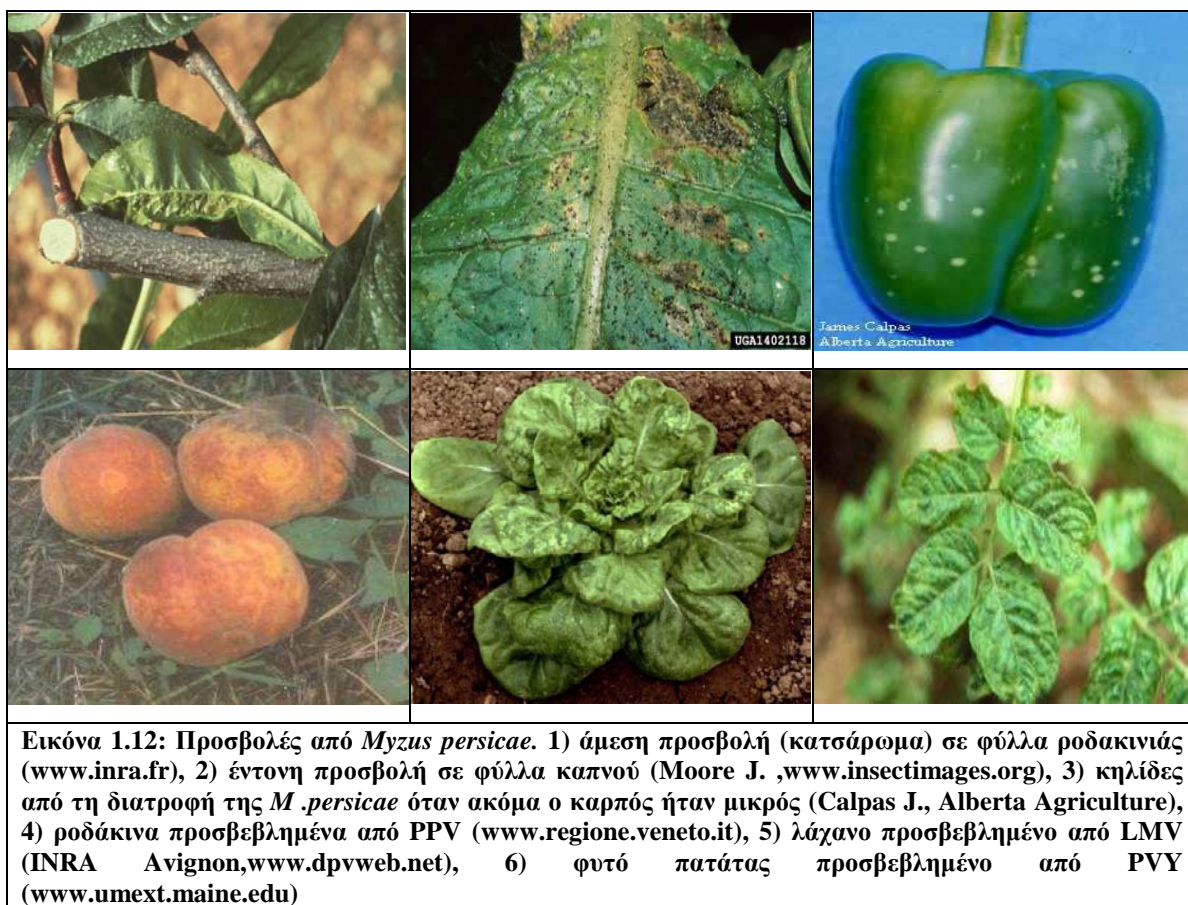
### 1.6.Ζημιές

Η επίδραση της *M. persicae* στα φυτά ξενιστές αφορά την προσβολή των φυτών είτε άμεσα ως αποτελέσμα της διατροφής και διαβίωσης της αφίδας πάνω σε αυτά είτε έμμεσα και συνδέεται με το ρόλο της αφίδας ως φορέας ιών.

Η διαδικασία της μύζησης λειτουργεί ως απορροφητικός μηχανισμός (sink) αφαιρώντας συστατικά από το φυτό κάτι που σε περιπτώσεις μικρού πληθυσμού αφίδων δεν προκαλεί απαραίτητα ζημιά. Σε μεγαλύτερη όμως προσβολή η διαδικασία αυτή προκαλεί εξάντληση των υδατανθράκων με ακόλουθες επιπτώσεις στη μείωση της ριζικής παραγωγής. Η μείωση του ριζικού συστήματος αλλά και η απορρόφηση των υγρών από το έντομο συνοδεύεται με πρόωρη μάρανση του φυλλώματος. Η συστροφή και το κατσάρωμα των φύλλων δεν είναι συμπτώματα τυπικά της συγκεκριμένης αφίδας καθώς τρέφεται σε ιστούς που έχουν σταματήσει να αναπτύσσονται αλλά μπορεί να προκαλέσουν σοβαρό κατσάρωμα στα δέντρα την άνοιξη. Ένα άλλο πολύ χαρακτηριστικό σύμπτωμα που συνοδεύει την προσβολή από τη *M. persicae* είναι η παραγωγή μελιτώματος από τα αποχωρήματά της. Η *M. persicae* σε σύγκριση με άλλα είδη αφίδων παράγει πολύ λιγότερα μελιτώδη αποχωρήματα και σημαντικές αποθέσεις παρατηρούνται συνήθως στο θερμοκήπιο αν και έχουν αναφερθεί και σε εξωτερικές καλλιέργειες καπνού. Καθώς τα μελιτώματα εξατμίζονται η συγκέντρωση των σακχάρων τους φτάνει σε τέτοιο επίπεδο που προκαλεί πλασμόλυση στο φύλλο ενώ παράλληλα αποτελεί μέσο για την ανάπτυξη μυκήτων καπνιάς (van Emden, 1969).

Η ίδια η διαδικασία διατροφής της αφίδας στο φυτό ξενιστή την καθιστά φορέα για ένα πλήθος έμμονων και μη έμμονων ιών. Από αυτούς αρκετά σημαντικοί είναι οι έμμονοι ιοί του καρουλιάσματος του φύλλου της πατάτας (PLRV), του καρουλιάσματος του φύλλου του μπιζελιού (PLR), της παραμόρφωσης των νεύρων

του καπνού (TVD) και οι μη έμμονοι ιοί του ιού Y της πατάτας (PVY), του ιού A της πατάτας (PVA), του ιού του μωσαϊκού της μηδικής (AMV), του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), και του ιού του κίτρινου μωσαϊκού της αγγουριάς (ZYMV). Οι έμμονοι ιοί απαιτούν περισσότερο χρόνο για την απόκτησή τους καθώς και μια λανθάνουσα περίοδο μέχρι να είναι σε θέση να μεταδίδονται. Εισέρχονται στο φορέα μετά την κατάποση των ιοσωματίων μαζί με το φυτικό χυμό κατά τη διατροφή του εντόμου στον ιστό ενός προσβεβλημένου από τον ιό φυτού. Στη συνέχεια μεταφέρονται από την κοιλότητα του εντέρου στην αιμολέμφο όπου με τη βοήθεια



πρωτεϊνών δεν υφίστανται πλασμόλυση. Από το επίπεδο του σιελογόνου αδένα ελευθερώνονται στο σιελοφόρο κανάλι και από εκεί μέσω της διείσδυσης των σιλιέτων κατά τη διαδικασία της διατροφής μεταδίδονται σε άλλα φυτά. Σε όλη αυτή τη διαδρομή συναντά πολλά φυσιολογικά εμπόδια γεγονός που προσδίδει μια εξειδίκευση του φορέα στον ιό κάτι που αντισταθμίζεται από τη μεγάλη χρονική διάρκεια διατήρησής του στο φορέα (Zitter,1977, Singh, 1996, Rouze-Jouan et al., 2001). Οι μη έμμονοι ιοί από την άλλη μπορούν να αποκτηθούν από τις σύντομες επιδερμικές διεισδύσεις των σιλιέτων που γίνονται για την αξιολόγηση τις

καταλληλότητας του φυτικού ιστού. Τα ιοσωμάτια προσλαμβάνονται από τα ιωμένα φυτά και με τη βοήθεια πρωτεϊνών διατηρούνται στον τροφικό αγωγό των στιλέτων της κάτω γνάθου. Από εκεί τα ιοσωμάτια μεταδίδονται σε νέο φυτό κατά την εξαγωγή υδατικής σιέλου στο κυτόπλασμα του νέου φυτού κατά τη διαδικασία διατροφής σε αυτό. Τα ιοσωμάτια αναμειγνύονται με την υδατική σιέλο στο σημείο σύγκλισης των δύο αγωγών (τροφικός αγωγός και σιελοφόρος αγωγός) λίγο πριν από την έξοδο (Powell, 2005, Pirone & Perry, 2002). Οι μη έμμονοι ιοί δε διατηρούνται παραπάνω από μια ώρα σε αφίδες που τρέφονται και λίγες ώρες σε αφίδες που δεν τρέφονται και η μετάδοσή τους γίνεται ταχύτατα κατά τη σύντομη διείσδυση των στιλέτων σε νέο φυτό οπότε και το έντομο χάνει τον ιό (Zitter, 1977)

## 2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

### 2.1. Γενικά

Η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων οδήγησε στην ευρέως εξαπλωμένη ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά είδη εντόμων και είναι ένα σημαντικό παράδειγμα της ανθρωπογενούς φυσικής επιλογής (French-Constant et al., 2004). Ανθεκτικότητα συμβαίνει όταν ένας πληθυσμός δε μπορεί πλέον να ελεγχθεί ικανά από τις συνιστώμενες δόσεις εφαρμογής των εντομοκτόνων που δίνουν καλό έλεγχο σε άλλους πληθυσμούς του ίδιου είδους. Δε θα πρέπει να συγχέεται με τη φυσική ανεκτικότητα κατά την οποία τα 'κανονικά' ευαίσθητα άτομα ενός είδους είναι ανεπηρέαστα από τις δόσεις εφαρμογής που σε άλλα είδη είναι αποτελεσματικές. (Devonshire, 1987). Ο ορισμός που δίνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) είναι 'η κληρονομούμενη ικανότητα ενός κλώνου ενός οργανισμού να επιβιώνει δόσεων τοξικής ουσίας που θα θανάτωναν την πλειοψηφία ατόμων ενός κανονικού πληθυσμού του ίδιου είδους (WHO, 1957).

Πριν από το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο τα εντομοκτόνα ήταν κυρίως ανόργανα και επικίνδυνα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τους 'ανταγωνιστές' του, τα έντομα. Η πολλαπλότητα των τρόπων δράσης των εντομοκτόνων αυτών εμπόδιζε την εξέλιξη της ανθεκτικότητας. Μέχρι το 1946 μόνο 12 περιπτώσεις ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είχαν αναφερθεί. Τα εντομοκτόνα δεύτερης γενιάς (οργανοφωσφορικά, καρβαμικά, πυρεθροειδή) ήταν τα περισσότερα ασφαλέστερα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και μπορούσαν να είναι πιο εκλεκτικά απέναντι στα έντομα καθώς επιδρούσαν σε μια συγκεκριμένη βιοχημική θέση. Η εξειδίκευση όμως αυτή επέτρεψε την ταχεία εξέλιξη της ανθεκτικότητας (Mallet, 1989). Το πρόβλημα έχει εξαπλωθεί ευρέως γεωγραφικά και υπάρχουν τουλάχιστον 504 είδη αρθρόποδων ανθεκτικά σε μία ή περισσότερες οικογένειες εντομοκτόνων (Georgiou & Lagunes-Tejeda, 1991).

### 2.2. Ανάπτυξη και εξέλιξη της ανθεκτικότητας

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας οφείλεται σε μεταλλάξεις που προκύπτουν από τη δράση γονιδίων που υπάρχουν στο φυσικό πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις αυτές προϋπάρχουν της εισαγωγής ενός εντομοκτόνου σε μια περιοχή σε συχνότητες όχι εύκολα ανιχνεύσιμες. Με τη χρήση ενός εντομοκτόνου για τον έλεγχο του πληθυσμού τα ανθεκτικά άτομα επιλέγονται και εφόσον είναι βιώσιμα γίνονται κυρίαρχα στον πληθυσμό. Στη συνέχεια μέσω της μετανάστευσης διασπείρονται σε μεγαλύτερο



γεωγραφικό εύρος. Όσο εντατικότερη είναι η χρήση του εντομοκτόνου τόσο μεγαλύτερη είναι η πίεση επιλογής για ανθεκτικά άτομα. Κατά τους Tabashnik & Croft (1985) η ανθεκτικότητα είναι πιο πιθανή να συμβεί με εντομοκτόνα μεγαλύτερης υπολειματικότητας, με πιο συχνή και αναλογικά μεγαλύτερη έκθεση του πληθυσμού, με εφαρμογή πιο ποικίλων δόσεων και σε πληθυσμούς με μεγαλύτερη ιστορία ανθεκτικότητας σε άλλες οικογένειες εντομοκτόνων (R. Van Toor & Teulon, 2005).

Η ανθεκτικότητα χαρακτηρίζεται από ταχεία εξέλιξη υπό ισχυρή επιλογή. Πρέπει να θεωρήσουμε ότι σε μια ψεκαζόμενη περιοχή δε θανατώνεται το 100% το εντόμων, υπάρχει δηλαδή μια δεξαμενή αμεταχειρίστων ατόμων η οποία προκύπτει είτε επειδή είναι αδύνατο να καλυφθεί εξ' ολοκλήρου και ομοιόμορφα μια επιφάνεια με ένα εντομοκτόνο ή γιατί έξω από την ψεκαζόμενη περιοχή υπάρχει ένας πληθυσμός, που δε θα έχει δεχθεί έκθεση σε εντομοκτόνα και ο οποίος σταδιακά μέσω της μετανάστευσης θα αναμειχθεί με τον εκτεθειμένο πληθυσμό. Εάν η δεξαμενή των μη εκτεθειμένων εντόμων είναι άπειρη τότε η εμφάνιση της ανθεκτικότητας θα καθυστερήσει αρκετά από ότι εάν δεν υπήρχε μετανάστευση μη εκτεθειμένων σε εντομοκτόνα ατόμων προς τον πληθυσμό. Παρ' όλ' αυτά όμως θα υπάρχει ένας ρυθμός μετανάστευσης κάτω από τον οποίο η ανθεκτικότητα θα εξελίσσεται ταχέως καθώς ο εκτεθειμένος πληθυσμός θα εξελίσσεται ανεξάρτητα από τη δεξαμενή μη εκτεθειμένων. Πρακτικά η δεξαμενή μη εκτεθειμένων εντόμων είναι πεπερασμένη αριθμητικά και η ανθεκτικότητα σταδιακά θα ρυθμιστεί στον πληθυσμό μέσω της επιλογής καθώς υπάρχει και το ενδεχόμενο της μετανάστευσης και ανθεκτικών προς τον πληθυσμό. Παρ' όλ' αυτά η μετανάστευση από μια πεπερασμένη δεξαμενή θα καθυστερήσει την εξέλιξη της ανθεκτικότητας (Mallet, 1989).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την εξέλιξη της ανθεκτικότητας είναι η πυκνοεξαρτώμενη ρύθμιση του πληθυσμού. Αν υποθέσουμε ότι ο πληθυσμός ελέγχεται ελαφρά από θηρευτές και παράσιτα, ο πληθυσμός θα επιστρέψει μόνο ασυμπτωτικά στην αρχική ισορροπία μετά την έκθεση σε εντομοκτόνο και τα ευαίσθητα άτομα που θα μεταναστεύσουν στον πληθυσμό θα εμποδίσουν την εξέλιξη της ανθεκτικότητας περισσότερο από την περίπτωση που ο πληθυσμός επέστρεφε ακριβώς στα επίπεδα ισορροπίας μετά τον ψεκασμό. Αντίθετα, αν ο πληθυσμός τείνει να υπερβεί τα επίπεδα της ισορροπίας τότε ανεξάρτητα από την εισροή σε αυτόν ευαίσθητων ατόμων μέσω μετανάστευσης η εξέλιξη της ανθεκτικότητας θα είναι

ραγδαία. Η δύναμη της πυκνοεξάρτησης είναι αυστηρά ανάλογη του ενδογενή ρυθμού αύξησης ( $r$ ). Έτσι ψεκάζοντας έναν πληθυσμό ταυτόχρονα στην περίπτωση μη εκλεκτικών εντομοκτόνων θανατώνονται και οι φυσικοί εχθροί του πληθυσμού, αυξάνοντας έτσι το  $r$  για τον αρχικό πληθυσμό των εντόμων εχθρών της καλλιέργειας λόγω της χαλάρωσης του φυσικού ελέγχου με αποτέλεσμα να αυξηθεί ταχύτατα η ανθεκτικότητα στον πληθυσμό. Ταυτόχρονα, ο πληθυσμός των φυσικών εχθρών που θα έχει παραμείνει θα μειώσει αρχικά το  $r$  του καθώς θα είναι δύσκολο να βρει τη λεία του που σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα έντομα εχθροί διαθέτουν από τη φύση τους μηχανισμούς μεταβολισμού των τοξικών που διαθέτουν τα φυτά, οι φυσικοί εχθροί θα έχουν πάντα χαμηλότερο ρυθμό εξέλιξης της ανθεκτικότητας στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ευρέως φάσματος εντομοκτόνα (Mallet, 1989).

### **2.3. Τύποι και μηχανισμοί ανθεκτικότητας**

Τα έντομα έχουν εκμεταλλευθεί κυριολεκτικά κάθε μέσον για να αντεπεξέλθουν στα εντομοκτόνα. Προσαρμογές ανάλογες αφορούν είτε την αύξηση της ηθολογικής αποφυγής, μείωση της περατότητας της μεμβράνης, ταχεία μετατροπή των εντομοκτόνων σε εκκρινόμενα πολικά συστατικά ή μείωση της ευαισθησίας του βιοχημικού στόχου

#### **2.3.1. Ηθολογική ανθεκτικότητα**

Η ηθολογική ανθεκτικότητα συμβαίνει όταν τα έντομα είναι ικανά να αποφύγουν την επαφή με τα εντομοκτόνα. Τέτοιας μορφής ανθεκτικότητα έχει αναφερθεί για διάφορες οικογένειες εντομοκτόνων, όπως τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή. Τα έντομα είναι δυνατόν να σταματήσουν να τρέφονται εάν συναντήσουν συγκεκριμένα εντομοκτόνα ή να εγκαταλείψουν την περιοχή όπου έχει εφαρμοστεί εντομοκτόνο (μετακίνηση βαθύτερα στην κόμη ή στην κάτω επιφάνεια του φύλλου). Μόνο λίγα παραδείγματα είναι γνωστά (Georgiou 1986, Plapp, 1984) αλλά πολλά άλλα μπορεί να έχουν παραληφθεί καθώς δεν είναι εύκολη η ανίχνευση της ηθολογικής ανθεκτικότητας λόγω δυσκολίας των ηθολογικών βιοδοκιμών (Mallet, 1989).

#### **2.3.2. Μειωμένη διείσδυση**

Η μειωμένη διείσδυση συμβαίνει όταν το έντομο μπορεί να επιβραδύνει την απορρόφηση των χημικών στο σώμα του επειδή η κουτίκουλα έχει αναπτύξει

φράγματα ενάντια σε αυτά. Ο συγκεκριμένος τύπος ανθεκτικότητας είναι παρόν στα έντομα μαζί με άλλους τύπους ανθεκτικότητας και η μειωμένη διείσδυση εντατικοποιεί τις επιδράσεις των άλλων μηχανισμών. Διαφορές στη μεταφορά μέσω της κουτίκουλας έχουν αναφερθεί στις οικιακές μύγες και σε λεπιδόπτερα (Plapp, 1984, Little et al., 1988) και στην οικιακή μύγα ένα γονίδιο (*pen*) έχει τη μέγιστη επίδραση στο φαινόμενο (Mallet, 1989).

### 2.3.3. Μεταβολική ανθεκτικότητα

Η μεταβολική ανθεκτικότητα αναφέρεται στην αυξημένη ικανότητα αποτοξίκωσης των χημικών από το έντομο. Η ικανότητα αυτή προέρχεται από την αυξημένη παραγωγή ή έκφραση ενζύμων μεταβολισμού, αποτοξίκωσης ξενοβιοτικών. Τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος σε αυτή τη διαδικασία προσδίδοντας ανθεκτικότητα στα έντομα σε πολλές οικογένειες εντομοκτόνων είναι οι εξαρτώμενες από το κυτόχρωμα P450 μονοοξυγενάσες, οι εστεράσες και οι glutathione-S-transferases.

#### 2.3.3.α. Μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450

Μελέτες σε πολλά είδη εντόμων έχουν εμπλέξει μια πληθώρα διαφορετικών γονιδίων που αποκωδικοποιούν το κυτόχρωμα P450 στα ανθεκτικά στα εντομοκτόνα έντομα. Η υπερπαραγωγή ενζύμων του συγκεκριμένου συστήματος οφείλεται περισσότερο στην υπέρμεταγραφή των γονιδίων που ελέγχουν τα ένζυμα παρά την ενίσχυσή τους. Από μελέτες σε κλώνους της *Drosophila melanogaster* αναγνωρίστηκαν τουλάχιστον 90 γονίδια που κωδικοποιούν το κυτόχρωμα P450 αλλά μόνο ένα γονίδιο το *Cyp6g1* ήταν υπέρμεταγραμμένο. Σύγκριση των ανθεκτικών με ευαίσθητους *Cyp6g1* αλληλόμορφους έδειξε ότι οι ανθεκτικοί αλληλόμορφοι είχαν μια εισαγωγή ενός *Accord* μεταθετού στοιχείου στο 5' άκρο τους. Έτσι παρά την πολυπλοκότητα του ενζυμικού συστήματος των P450, η μεταγραφή γονιδίων ενός κυτοχρώματος P450 μπορεί να επιλεγθεί ευρέως στους φυσικούς πληθυσμούς. Ενώ εργαστηριακά έχουν αναγνωριστεί πολλά γονίδια που σχετίζονται με το P450, πρέπει να υπάρχουν μοναδικές ιδιότητες του γονιδίου *Cyp6g1*, όπως ευρεία διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε διαφορετικά εντομοκτόνα, που ευνοούν την επιλογή του στον αγρό. Επομένως η υπερέκφραση του *Cyp6g1* δίνει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών οικογενειών εντομοκτόνων όπως το DDT, τα νεονικοτινοειδή, τα οργανοφωσφορικά ακόμα και

ρυθμιστές ανάπτυξης, όπως το lufenuron, ενώ άλλα κυτοχρώματα P450, που έχουν υπερμεταγραφεί σε κλώνους που έχουν επιλεγεί εργαστηριακά, επιδεικνύουν πιο στενό εύρος διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (ffrench-Constant et al., 2004).

### 2.3.3.β. Εστεράσες

Οι αλλαγές στην ενζυμική λειτουργία στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα που προκαλείται από τις εστεράσες είχαν αναφερθεί αρχικά ως μείωση της δραστηριότητας της καρβοξυλεστεράσης των ανθεκτικών στα οργανοφωσφορικά κλώνων οικιακών μυγών (Van Asperen et al., 1959, Hughes et al., 1985, Townsend et al., 1969, ffrench-Constant et al., 2004). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην αντίληψη ότι οι ανθεκτικοί κλώνοι είχαν μειωμένη ικανότητα να υδρολύσουν τα καρβοξυλεστερασικά υποστρώματα αλλά είχαν κερδίσει την ικανότητα να υδρολύουν τα οργανοφωσφορικά υποστρώματα (ali-esterase hypothesis) (Oppernoorth, 1960, ffrench-Constant et al., 2004). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε για τη *Lucilia cuprina*, όπου σημειώνεται στο γονίδιο *LcaE7*, που κωδικοποιεί την E3 εστεράση, η αντικατάσταση ενός αμινοξέος (γλυκίνη στη θέση 137 με ασπαρτικό οξύ) στο καταλυτικό κέντρο της εστεράσης (Newcomb et al., 1997).

Σε ανθεκτικότητα μπορεί επίσης να οδηγήσει η υπερμεταγραφή γονιδίων των εστερασών είτε μέσω ρύθμισης των γονιδίων και/ή μέσω ενίσχυσης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις εστεράσες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της *M. persicae* και διαφόρων κουνουπιών. Η ανθεκτικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις προέρχεται από την ενίσχυση των γονιδίων των εστερασών συχνά σε συνδυασμό με την αλλαγμένη ρύθμιση των γονιδίων που καταλήγει στην παραγωγή περισσότερης εστεράσης, που μπορεί να υδρολύσει ή να απομονώσει τα εντομοκτόνα. Στη *M. persicae* η ανθεκτικότητα σχετίζεται με την ενίσχυση της εστεράσης E4 ή FE4 (Field & Devonshire, 1998, Field et al., 1999). Ο μεταβολισμός των εντομοκτόνων είναι αργός αλλά επειδή η E4 μπορεί να αποτελεί το 3% του συνολικού βάρους του σώματος του εντόμου λειτουργεί ως σφουγγάρι για να απομονώσει τα εντομοκτόνα (Devonshire et al., 1998). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν σημειωθεί και στο κουνούπι *C. pipiens*, όπου διαφορετικοί τόποι εστεράσης μπορούν να ενισχυθούν είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό για να προσφέρουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά (Raymond et al., 1991, ffrench-Constant et al., 2004)

### 2.3.3.γ. Γλουταθειόνη-S-τρανσφεράσες (GST's)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης είναι μια μεγάλη οικογένεια από πολυλειτουργικά ένζυμα που εμπλέκονται στην αποτοξίκωση μεγάλου εύρους ξενοβιοτικών συμπεριλαμβανομένων και των εντομοκτόνων (Salinas & Wong, 1999, Enayati et al., 2005). Οι GSTs πρωταρχικά καταλύουν το σχηματισμό συμπλόκων των ηλεκτρόφιλων συστατικών με τη θειολική ομάδα της γλουταθειόνης κάνοντας γενικά τα τελικά προϊόντα περισσότερο υδατοδιαλυτά και εκκρινόμενα από τα υποστρώματα, που δεν είναι σύμπλοκα με τη γλουταθειόνη (Habig et al., 1974, Enayati et al., 2005). Επιπρόσθετα, κάποια GSTs καταλύουν την αντίδραση αποϋδροχλωρίωσης χρησιμοποιώντας αναγόμενη γλουταθειόνη ως συμπάραγοντας παρά ως σύμπλοκο (Clark & Shamaan, 1984, Enayati et al., 2005).

Η αυξημένη δραστηριότητα της GST έχει συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα σε όλες τις μεγάλες οικογένειες εντομοκτόνων (Prapanthadara et al., 1993, Huang et al., 1998, Vontas et al., 2001, Enayati et al., 2005). Η ανθεκτικότητα αποδίδεται σε αυξήσεις στην ποσότητα ενός ή περισσότερων ενζύμων GST είτε ως αποτέλεσμα ενίσχυσης γονιδίων ή πιο συχνά μέσω αυξήσεων στο ρυθμό μεταγραφής παρά λόγω ποιοτικών αλλαγών σε μεμονωμένα ένζυμα (Grant & Hammock, 1992, Ranson et al., 2001, Enayati et al., 2005). Η ανθεκτικότητα στο DDT οφείλεται στην αποϋδροχλωρίωση που καταλύεται από τις GSTs λειτουργώντας η γλουταθειόνη ως συμπάραγοντας ενώ σε άλλα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα στο σχηματισμό συμπλόκων με τη γλουταθειόνη. Οι GSTs είναι επίσης υπεύθυνες για πολλές περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά (Hayes & Wolf, 1998, Enayati et al., 2005) στα οποία ο σχηματισμός συμπλόκων με τη γλουταθειόνη καταλήγει στην αποτοξίκωσή τους μέσω είτε της ο- αποαλκυλίωσης (Oppenoorth et al., 1979), ή της ο-αποαρυλίωσης (Chiang & Sun, 1993). Οι GSTs δεν έχουν ακόμα εμπλακεί στον άμεσο μεταβολισμό των πυρεθροειδών παρ' όλ' αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτή την οικογένεια εντομοκτόνων με την αποτοξίκωση των προϊόντων της λιπιδικής περοξειδωσης που προάγεται από τα πυρεθροειδή (Vontas et al., 2001).

### 2.3.4. Μείωση της ευαισθησίας του βιοχημικού στόχου

Υπάρχουν τρεις κύριοι στόχοι των συμβατικών εντομοκτόνων: τα κανάλια ιόντων, τα κανάλια Νατρίου και η ακετυλοχολινεστεράση. Η ανθεκτικότητα εντόμων

σε εντομοκτόνα που δρουν σε έναν από τους παραπάνω βιοχημικούς στόχους οφείλεται σε αλλαγή της δομής της θέσης – στόχου των εντομοκτόνων.

#### 2.3.4.α. Κανάλια ιόντων

Τα κανάλια ιόντων δέχονται χημικά σήματα, νευροδιαβιβαστές, όπως ακετυλοχολίνη ή γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), τα οποία μετά μετατρέπουν σε ηλεκτρικά σήματα μέσω του ανοίγματος των ολικών καναλιών ιόντων τους. Ο υποδοχέας του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), είναι η θέση δράσης των κυκλοδιενίων αλλά και των φαινυλοπυραζολών (fipronil). Η ανθεκτικότητα στη *D. melanogaster* προκύπτει από ένα μόνο γονίδιο το *Rdl* στη θέση 66F, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 302, που είναι κρίσιμο αμινοξύ για την πρόσδεση των εντομοκτόνων, με σερίνη ή γλυκίνη. Η αντικατάσταση του ίδιου αμινοξέος προσφέρει ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο εύρος εντόμων.

Τα κανάλια ιόντων είναι θέση στόχος και για άλλα εντομοκτόνα, όπως τα νεονικοτινοειδή και οι αβερμεκτίνες. Τα νεονικοτινοειδή δρουν στους υποδοχείς ακετυλοχολίνης και έως τώρα δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά ανθεκτικότητας σε αυτά, που να συνδέονται με σημειακές μεταλλάξεις στις υπομονάδες του υποδοχέα, ενώ η ανθεκτικότητα στην αβερμεκτίνη ivermectin και το nodulisporic οξύ συνδέεται με την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην υπομονάδα GluCl<sub>α</sub> στο κανάλι χλωρίου, που καθιστά τα κανάλια χλωρίου λιγότερο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση από την ivermectin και το nodulisporic οξύ. Η σύνθεση του υποδοχέα δεν είναι βέβαιη αλλά από μελέτες ανοσοκαθίζησης φαίνεται να περιέχει είτε μία υπομονάδα GluCl<sub>α</sub> μόνο ή σε συνδυασμό με *Rdl* (ffrench-Constant et al., 2004).

#### 2.3.4.β. Κανάλια Νατρίου

Τα κανάλια Νατρίου διεγείρονται από αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης παρά αλλαγές στη συγκέντρωση του νευροδιαβιβαστή, όπως τα κανάλια ιόντων. Τα κανάλια Νατρίου είναι η θέση δράσης του DDT και των πυρεθροειδών και η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα σε αυτά τα εντομοκτόνα ονομάζεται *knockdown resistance (kdr)*. Η αντικατάσταση ενός αμινοξέος συνδέεται με την *kdr* ανθεκτικότητα ενώ μια δεύτερη αντικατάσταση ενός άλλου αμινοξέος συνδέεται με τη *super kdr* ανθεκτικότητα. Τα αμινοξέα αυτά είναι διαφορετικά για τα διάφορα είδη εντόμων, η θέση όμως είναι κοινή.

#### 2.3.4.γ. Ακετυλοχολινεστεράση

Η ακετυλοχολινεστεράση διασπά το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη και είναι η θέση στόχος των οργανοφωσφορικών και των καρβαμικών. Το πρώτο γονίδιο που κωδικοποιεί την ακετυλοχολινεστεράση, *Ace*, κλωνοποιήθηκε από τη δροσόφιλα ενώ σε άλλα είδη βρέθηκαν δύο διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, που δρουν στη συγκεκριμένη θέση, προέρχεται από την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην ενεργή θέση του ενζύμου.

#### 2.4. Καταγωγή της ανθεκτικότητας

Ο αριθμός των ανεξάρτητων καταγωγών των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα είναι σημαντικός για τον υπολογισμό της σχετικής σημασίας του ρυθμού μεταλλάξεων και μετανάστευσης στην εξάπλωση των ανεξάρτητων αλληλομόρφων ανθεκτικότητας. Ο αριθμός των ανεξάρτητων καταγωγών της ανθεκτικότητας εξαρτάται ισχυρά από το σχετικό ρόλο των μεταλλάξεων, της επιλογής και της μετανάστευσης σε διαφορετικούς πληθυσμούς εντόμων. Επίσης ο ρυθμός μετανάστευσης και επομένως η διάδοση της ανθεκτικότητας μπορεί να επηρεάζεται ισχυρά από τον άνθρωπο.

Αρχικά θεωρήθηκε ότι ένα ανθεκτικό αλληλόμορφο μπορούσε να έχει μια παγκόσμια καταγωγή. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε σε μελέτες στο κουνούπι *C. pipiens* και υποδήλωνε ότι μετά το αρχικό γεγονός ενίσχυσης της εστεράσης B2, που ήταν ίδιο σε πολλές αλληλουχίες εντόμων ανεξάρτητα της γεωγραφικής καταγωγής τους, ο ανθεκτικός αλληλόμορφος είχε διαδοθεί παγκόσμια μέσω μετανάστευσης.

Στην περίπτωση του γονιδίου *Cyp6g1*, που προδίδει ανθεκτικότητα στο DDT στη δροσόφιλα η πλήρης συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του *Accord* μεταφερόμενου στοιχείου και της ανθεκτικότητας στο DDT και το γεγονός ότι όλοι οι ανθεκτικοί αλληλόμορφοι είναι όμοιοι συμβαδίζει με τη θεωρία της μιας καταγωγής ανθεκτικότητας. Οι ανθεκτικοί αλληλόμορφοι είχαν ταυτόσημες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και ήταν ίδιες με μόνο έναν από τους πολλούς απλοτύπους, που σημαίνει ότι το στοιχείο μετακινήθηκε μόνο μια φορά σε έναν ευαίσθητο απλότυπο. Επίσης κανένας άλλος τύπος του κυτοχρώματος P450 φαίνεται να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στον αγρό.

Στην περίπτωση όμως του *Rdl* γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο dieldrin μελέτες στο *Tribolium castaneum*, που σημείωσαν την ύπαρξη πολλών

διαφορετικών ανθεκτικών απλοτύπων αλλά και διαφόρων πιθανών προγόνων αυτών, έδειξαν ότι διάφορες ανεξάρτητες καταγωγές της ίδιας μετάλλαξης είναι πιθανό να συνέβησαν παγκόσμια με διαφορετικούς αλληλόμορφους να διαδόθηκαν στον πλανήτη.

Πολλαπλές ανεξάρτητες καταγωγές ανθεκτικότητας φαίνονται σε γενετικά απομονωμένες ταξονομικές μονάδες, όπως υποείδη, βιότυποι ή κλώνοι. Η παραλλακτικότητα των απλοτύπων των *Ace-1* σε 2 διαφορετικά υποείδη *C. pipiens* υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη που προκαλεί τη μη ευαισθησία του ενζύμου αναπτύχθηκε ανεξάρτητα σε κάθε υποείδος. Αντίστοιχοι πολυμορφισμοί στην *Rdl* μετάλλαξη παρατηρούνται σε ανθεκτικούς διαφορετικούς βιοτύπους *Bemisia* ενώ κλώνοι της *M. persicae* όχι μόνο περιέχουν μοναδικές ενισχύσεις των επιπέδων E4 ή FE4 εστερασών αλλά έχουν και σταθερή σύνθεση άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας όπως *kdr* και MACE σε κάθε κλώνο (ffrench-Constant et al., 2004).

## **2.5. Προβλήματα που προκύπτουν από την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας**

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα δυσχεραίνει το έργο του ελέγχου των εντόμων εχθρών καλλιεργειών με χημικά μέσα. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί έκρηξη στον αριθμό των ανθεκτικών ειδών σε πολλές οικογένειες χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών την ίδια στιγμή που η εισαγωγή νέων εντομοκτόνων έχει αργό ρυθμό λόγω των ρυθμίσεων και κανονισμών για τον περιορισμό της περιβαλλοντικής καταστροφής που συνεπάγονται αυξημένο κόστος παραγωγής τους. Παράλληλα οι φυσικοί εχθροί των εντόμων αναπτύσσονται σε πολύ μικρότερο βαθμό ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα και αυτό οφείλεται επί μέρους στην από τη φύση διάθεση των εντόμων εχθρών ανεπτυγμένων ενζυμικών συστημάτων αποτοξίκωσης τοξικών ουσιών, που διαθέτουν τα φυτά ξενιστές τους. Έτσι δυσχεραίνεται παράλληλα και ο έλεγχος των εντόμων εχθρών από τους ίδιους τους φυσικούς εχθρούς τους. Ταυτόχρονα, αυτή η συνέπεια της χρήσης των χημικών έχει οδηγήσει στη δημιουργία ουσιών εκλεκτικών για τα έντομα εχθρούς, κάτι που σημαίνει ότι ο στόχος δράσης τους περιορίζεται σε συγκεκριμένους βιοχημικούς τύπους με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται ακόμα πιο γρήγορα η μονογονική ανθεκτικότητα. Με τα όπλα για τον έλεγχο των εντόμων εχθρών να είναι περιορισμένα, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας αποκτά μεγαλύτερες διαστάσεις σε εποχές και χώρες που οι ανάγκες για αγροτική παραγωγή είναι αυξημένες. Ακόμα



μεγαλύτερες διαστάσεις αποκτά όταν η ανθεκτικότητα αφορά έντομα υγειονομικής σημασίας.

## **2.6. Ανθεκτικότητα της *Myzus persicae* στα εντομοκτόνα**

Ο τυπικός βιολογικός κύκλος των αφίδων περιλαμβάνει διάφορες παρθενογενετικές γενιές και μια σεξουαλική (κυκλική παρθενογένεση), αλλά σε πολλά είδη οι πληθυσμοί είναι εξ' ολοκλήρου μη σεξουαλικοί (υποχρεωτική παρθενογένεση) με αποτέλεσμα σε αυτούς τους πληθυσμούς η γενετική παραλλακτικότητα να είναι γενικά χαμηλή και λίγοι γενότυποι να διασπείρονται σε μεγάλες γεωγραφικές περιοχές. Σε αυτό το φαινόμενο της χαμηλής γενετικής παραλλακτικότητας συνεισφέρουν και η γενετική παρέκκλιση και η φυσική επιλογή. Η *M. persicae*, η οποία χαρακτηρίζεται και από κυκλική και υποχρεωτική παρθενογένεση, έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας ως συνέπεια της εντατικής χρήσης εντομοκτόνων από τη δεκαετία του '50 (van Toor & Teulon, 2005). Οι Zanum και συνεργάτες (2005), ανέφεραν χαμηλή γενετική παραλλακτικότητα της *M. persicae* στη Γαλλία (16 γενότυποι σε 255 άτομα), με ένα κλώνο που περιείχε δύο μηχανισμούς ανθεκτικότητας συνδυασμένους να ανιχνεύεται σε όλους τους πληθυσμούς ανεξάρτητα από τη γεωγραφική θέση δειγματοληψίας τους. Η εντατικοποίηση των μεταχειρίσεων με εντομοκτόνα ευνόησε λίγους γενότυπους των αφίδων υποστηρίζοντας την άποψη ότι τα εντομοκτόνα μπορούν να επιλέγουν για ανθεκτικούς φαινότυπους σε ένα πληθυσμό εις βάρος της γενετικής ποικιλότητας. Η επιλογή αυτή μπορεί να συμβαίνει σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές που χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα. Στη Αγγλία βρέθηκαν δύο κλώνοι με τρεις μηχανισμούς ανθεκτικότητας και υπερίσχυαν σε περιοχές που εκτέθηκαν σε εντομοκτόνα, ενώ κλώνοι που είχαν ένα μηχανισμό ανθεκτικότητας ή κανένα ήταν κυρίαρχοι σε μη ψεκασμένες περιοχές (Fenton et al., 2005)

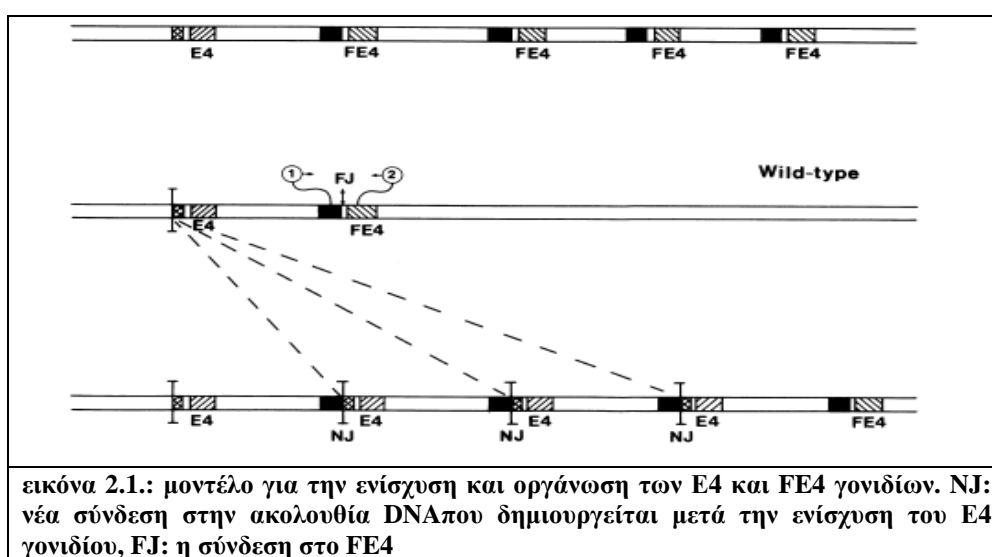
### **2.6.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας της *Myzus persicae***

Η εξέλιξη της ανθεκτικότητας στη *M. persicae* συνδέεται με τρεις γενετικά ανεξάρτητους μηχανισμούς (Devonshire et al., 1998), που αφορούν είτε την **αυξημένη αποικοδόμηση** του εντομοκτόνου με την υπερπαραγωγή μίας από της δυο στενά συνδεδεμένες καρβοξυλεστεράσες (E4 και FE4), που οδηγεί στην απομόνωση και αποτοξίκωση συγκεκριμένων εντομοκτόνων προσδίδοντας υψηλή ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και στα περισσότερα καρβαμικά και χαμηλότερη στα

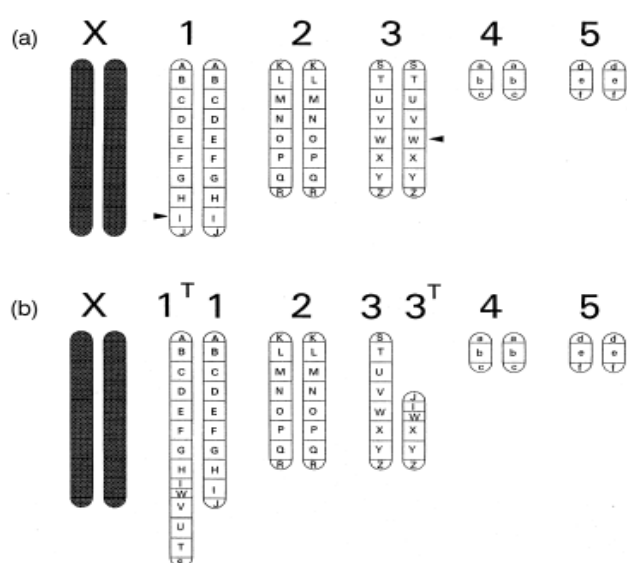
πυρεθροειδή (Devonshire & Moores, 1982), είτε τη **μη ευαισθησία της θέσης στόχου** που περιλαμβάνει την **τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση (MACE)** με την αντικατάσταση της σερίνης<sup>431</sup> με φαινυλαλανίνη (S431F) στην ενεργή θέση του ενζύμου, που προσδίδει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στα διμεθυλοκαρβαμιδικά (Moores et al., 1994) και τη μη ευαισθησία του νευρικού συστήματος του εντόμου που προκύπτει από αλλαγές στις διόδους νατρίου των νευρικών μεμβρανών λόγω αντικατάστασης σε δύο αμινοξέα στην πρωτεΐνη της διόδου (**knock down resistance**) που προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή και στο DDT (Martinez-Torres et al., 1999b, Eleftherianos et al., 2002).

### 2.6.1.1. Υπερπαραγωγή καρβοξυλεστερασών

Η ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν άτομα της *M. persicae* σε συγκεκριμένες οικογένειες εντομοκτόνων (οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή) συνδέεται με την αυξημένη σύνθεση δύο καρβοξυλεστερασών της E4 (Devonshire & Moores, 1982) και της στενά συνδεδεμένης με την προηγούμενη FE4 (Devonshire, Moores & Chiang, 1983), οι οποίες υδρολύουν και απομονώνουν τους εστέρες των παραπάνω εντομοκτόνων. Η υπερπαραγωγή των παραπάνω εστερασών προέρχεται και στις δύο περιπτώσεις από την παρουσία αντίστοιχων ενισχυμένων γονιδίων (Field et al., 1993). Τα E4 και FE4 γονίδια που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες εστεράσες είναι τμήμα μιας οικογένειας γονιδίων και οι ευαίσθητες αφίδες έχουν ένα αντίγραφο από το κάθε ένα με το E4 αντίθετο του FE4 και με σχεδόν 19 kb απόσταση (ενδιάμεση αλληλουχία) (Field & Devonshire, 1998).



Τα γονίδια βρίσκονται κοντά σε μια υποτελομερική (subtelomeric) ομάδα ετεροχρωματικών επαναλαμβανόμενων DNA στο αυτόσωμα 1 (Blackman et al., 1999). Αυτή περιέχει πολυάριθμα αντίγραφα μιας επανάληψης αλληλουχίας 160 bp (ζεύγη βάσεων) της ομάδας της *M. persicae* (*M. persicae* group repeat : MrR), η οποία επίσης συμβαίνει υποτελομερικά πάνω σε άλλα αυτοσώματα (Spence et al., 1998). Για το E4 γονίδιο η ενίσχυση συνδέεται με μία αυτοσωμική 1,3 μετατόπιση, που καταλήγει στα ενισχυμένα γονίδια σε μια ετεροζυγωτική θέση 3<sup>T</sup> (Blackman et al., 1995), έχοντας μεταφερθεί εκεί από το αυτόσωμα 1, μαζί με πολυάριθμα αντίγραφα του MrR, κατά τη διάρκεια της αμοιβαίας ανταλλαγής. Σε αυτή τη θέση τα ενισχυμένα E4 γονίδια είναι πάνω σε 24kb μονάδες DNA (amplicons) (Field et al., 1996) παρόντα ως διπλή παράταξη άμεσων επαναλήψεων σε όλο το μήκος (Field & Devonshire, 1997). Σε αντίθεση με τη μία θέση του ενισχυμένου E4, τα FE4 γονίδια μπορούν να συμβούν σε τρεις έως πέντε θέσεις σε διάφορα διαφορετικά χρωμοσώματα (Blackman et al., 1995, 1999). Παρ' όλ' αυτά τα FE4 γονίδια συμβαίνουν σταθερά στη θέση πάνω στο αυτόσωμα 1, το οποίο θεωρείται να είναι η θέση των μη ενισχυμένων γονιδίων και η μεταφορά – κίνηση σε άλλες θέσεις μπορεί να συνέβη με αναστροφή, αμοιβαίες ανταλλαγές και πιθανώς σε συσχέτιση με μεταφερόμενα στοιχεία (Blackman et al., 1999). Έτσι οι ανθεκτικές αφίδες έχουν μία από τις δύο ενισχυμένες εστεράσεις ανάλογα με τον καρυότυπό τους: οι ετεροζυγωτικές αφίδες για την αυτοσωμική (A) 1,3 μετατόπιση έχουν ενισχυμένη την E4 εστεράση ενώ οι αφίδες χωρίς τη μετατόπιση έχουν ενισχυμένη την FE4 εστεράση (Blackman et al., 1999).



Εικόνα 2.2.: Σύστημα της τμηματικής διαίρεσης των αυτοσωμάτων της *Myzus persicae* a) κανονικός καρυότυπος. Τα βέλη δείχνουν τα θεωρούμενα σημεία κοπής που οδηγούν στον b) καρυότυπο με αυτοσωμική 1,3 μετατόπιση (από Blackman et al., 1998)

Ο καρυότυπος και ο τύπος της εστεράσης που παράγεται φαίνεται να σχετίζεται με την κατηγορία βιολογικού κύκλου στην οποία ανήκει το άτομο και ανάλογα σημειώνεται και η εξέλιξη και κληρονομικότητα της ανθεκτικότητας. Έτσι, οι γενότυποι που παράγουν E4 εστεράση κατανέμονται στις ζεστές – τροπικές περιοχές και στα θερμοκήπια, όπου παρατηρούνται και τα περισσότερα ανολοκυκλικά άτομα, ενώ οι γενότυποι χωρίς τη μετατόπιση που παράγουν την FE4 εστεράση βρίσκονται στις περιοχές που καλλιεργούνται ροδακινιές, όπου και παρατηρούνται σε μεγαλύτερη συχνότητα τα ολοκυκλικά άτομα (Blackman et al., 1999).

Έχει χρησιμοποιηθεί μια ανοσοδοκιμή για τον υπολογισμό της ποσότητας των E4 ή FE4 ενζύμων που υπάρχουν σε μεμονωμένες αφίδες για την ποσοτικοποίηση του επιπέδου ανθεκτικότητας ως S (ευαίσθητο), R1, R2, R3 με περίπου τετραπλάσια αύξηση στην ποσότητα των ενζύμων μεταξύ κάθε κατηγορίας (Devonshire et al., 1986). Με (quantitative competitive) QC- PCR έχει αποδειχτεί ότι αυτό αντικατοπτρίζει μια αναλογική αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων, που ανέρχεται περίπου σε 80 αντίγραφα για το E4 ή το FE4 σε R3 αφίδες (Field et al., 1999, 2003)

Μια ενδιαφέρουσα πλευρά στην ανθεκτικότητα που προέρχεται από τα ενισχυμένα E4 και FE4 γονίδια στη *M. persicae* είναι ότι μπορεί να είναι ασταθής σε κάποιους πολύ ανθεκτικούς R3 κλώνους, με μια απότομη απώλεια της αυξημένης εστεράσης, που συμβαίνει σε κάποιους απογόνους μέσα σε μια γενιά (ffrench-Constant et al., 1988). Τέτοιοι ‘αναστρέψιμοι’ θα κατηγοριοποιηθούν ως S ή R1 φαινότυποι με ανοσοδοκιμή, ενώ εξέταση του DNA τους δείχνει ότι είναι γενοτυπικά ακόμα R3 (Field et al., 1989b).

Τα ενισχυμένα E4 γονίδια περιέχουν την πέμπτη βάση 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC), που βρίσκεται μέσα στις CpG διπλέτες, μέσα και γύρω από τα γονίδια, με το μοναδικό ζεύγος γονιδίων να είναι μη μεθυλιωμένο (Field et al., 1989a, 2000). Ο ρόλος της μεθυλίωσης είναι πολύ σημαντικός καθώς είναι αναγκαία για την έκφραση ή την αποσιώπηση του E4 γονιδίου. Η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA συνέβη ταυτόχρονα με την απώλεια της έκφρασης του E4 γονιδίου σε σειρές κλώνων της *M. persicae* (Hick et al., 1996) και σχετίζεται με απώλεια μεταγραφής όχι όμως και της συνολικής 5 μεθυλοκυτοσίνης που βρίσκεται στο γονιδίωμα της αφίδας (Field, 2000). Στοιχεία για μεθυλίωση ενισχυμένων γονιδίων υπάρχουν και σε άλλη αφίδα, τη

*Schizaphis graminum* (Rondani) (Ono et al., 1999) παρόλο που σε αυτή την περίπτωση δεν έχει αναφερθεί απώλεια μεθυλίωσης (Field, et al., 2004)

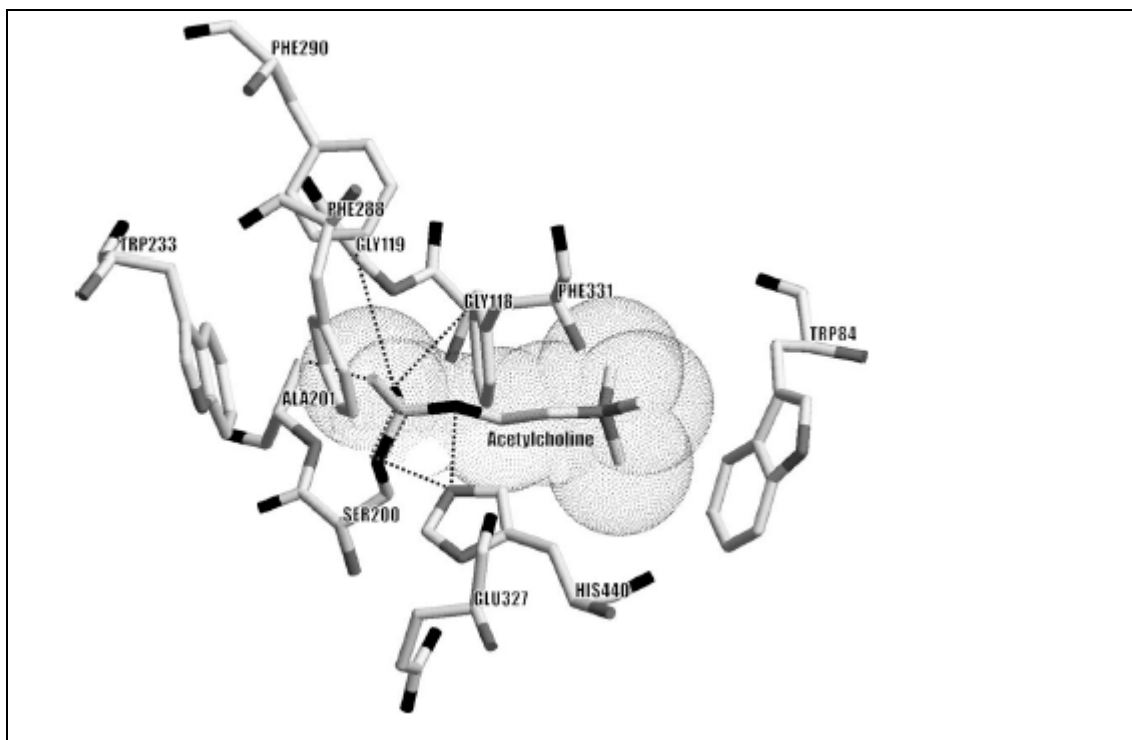
Τέτοια αντιστροφή παρατηρείται να συμβαίνει όχι μόνο σε καλλιέργειες κλώνων στο εργαστήριο αλλά και στο χωράφι. Κλώνοι που ξεκίνησαν να έχουν ευαίσθητα ή χαμηλού επιπέδου E4 άτομα που συγκεντρώθηκαν από τον αγρό συνήθως με ενδεδειγμένη εξέταση αποδεικνύονταν να είναι ‘ανεστραμμένα’ (Field et al., 1999). Παρόλο που η μεθυλίωση μπορεί να είναι ασταθής σε κλώνους, αυτό είναι πραγματικά σπάνιο γεγονός και τα μοτίβα μεθυλίωσης είναι περισσότερο συνήθως σταθερά και στους παρθενογενετικούς κλώνους και κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής αναπαραγωγής (Blackman et al., 1996). Είναι περισσότερο δύσκολο να μελετήσουμε την κληρονομικότητα του E4 γονιδίου γιατί η χρωμοσωμική μετατόπιση μειώνει την παραγωγή βιώσιμων απογόνων αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μοτίβα της 5mC πάλι διατηρούνται (Blackman et al., 1996).

#### **2.6.1.2. Μη ευαισθησία ακετυλοχολινεστεράσης στα εντομοκτόνα**

*2.6.1.2.α. Δομή και λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης και δράση των εντομοκτόνων σε αυτή*

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) τερματίζει τη μετάδοση ώσεων στη χολινεργική σύναψη υδrolύοντας την περίσσεια ακετυλοχολίνης (ACh) που απελευθερώνεται από την προσυναπτική μεμβράνη δημιουργώντας αρχικά ένα σύμπλοκο με αυτή (σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος), που στη συνέχεια η ακετυλοχολίνη ακετυλιώνει το ένζυμο και τέλος το ακετυλιωμένο ένζυμο υδrolύεται για να ξαναδώσει το αρχικό ένζυμο ελεύθερο.

Τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά έχουν δομή ανάλογη με αυτή του υποστρώματος της ακετυλοχολίνης και παρεμποδίζουν την ανταγωνιστική ακετυλοχολινεστεράση στην ενεργή θέση. Η υδρόλυση αυτών των παρεμποδιστών οδηγεί σε ένα ένζυμο με φωσφορυλιωμένη ή καρβαμυλιωμένη ενεργή σερίνη και καθυστερεί την επανενεργοποίηση του ενζύμου. Η παρεμπόδιση της AChE από τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα συσσωρεύει ακετυλοχολίνη στο συναπτικό κενό και προκαλεί αναισθητοποίηση (απευαισθητοποίηση) του υποδοχέα ακετυλοχολίνης, οδηγώντας σε ένα μπλοκάρισμα της μετάδοσης ώσεων (Kono & Tomita, 2006).



Εικόνα 2.3.: Σχηματική απεικόνιση της ενεργής πλευράς της AChE του *Torpedo californica* μαζί με το υπόστρωμα, την ακετυλοχολίνη. Εμφανίζονται κ 3-D θέσεις των αμινοξέων που συνιστούν την καταλυτική τριάδα (Ser200(**301**), Glu327(**427**) & His440(**541**)), την οξυανιόνική τρύπα (Gly118(**220**), Gly119(**221**) & Ala201(**302**)), την ακυλική θήκη (Trp233(**334**), Phe288(**392**) & Phe 290(Ser431)) και η ανιονική θέση πρόσδεσης (Trp84). Με διακεκομμένη γραμμή παριστάνονται οι δεσμοί υδρογόνου και στο διακεκομμένο κουτί ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των αμινοξέων και του υποστρώματος. Στις παρενθέσεις με κόκκινο χρώμα τα αντίστοιχα αμινοξέα της *Myzus persicae*. (από Kono & Tomita, 2006)

Η ακετυλοχολινεστεράση των εντόμων είναι μια ομοδιμερική σφαιρική πρωτεΐνη περίπου 150 kDa, η οποία συνδέεται με τις μεμβράνες από το τερματικό C με μια άγκυρα γλυκοσυλ-φωσφατυδυλ-ινοσιτόλης. Οι διμερείς υπομονάδες συνδέονται ομοιοπολικά με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Η πρωτεΐνη εκφράζεται ως ένας πρόδρομος, που στη συνέχεια γλυκοσυλιώνεται με την αντικατάσταση του τερματικού C της υδροφοβικής πεπτιδικής επέκτασης με γλυκολιπιδική άγκυρα. Η **ενεργή πλευρά** της ακετυλοχολινεστεράσης κείται κοντά στον πάτο ενός βαθιού και στενού φαραγγιού (gorge) που φτάνει μέχρι το μέσο περίπου μέσα στην πρωτεΐνη. Το φαράγγι επενδύεται με 14 υψηλά συντηρημένα αρωματικά υπολείμματα ο ρόλος των οποίων είναι η διευκόλυνση της διάχυσης του υποστρώματος στην ενεργή πλευρά. Εκεί υπάρχει μια **καταλυτική τριάδα** (catalytic triad) από Glu, His, Ser, με κατάλληλες αποστάσεις δεσμών υδρογόνου και ευθυγράμμιση στην ενεργή πλευρά. Δίπλα από την τριάδα σχηματίζεται η **οξυανιόνική «τρύπα»** (oxyanion hole) που σταθεροποιεί το καρβονυλικό οξυγόνο της ακετυλοχολίνης μέσω δεσμού υδρογόνου. Στο βάθος του αρωματικού «φαραγγιού» και δίπλα από το ενεργό κέντρο σχηματίζεται και η

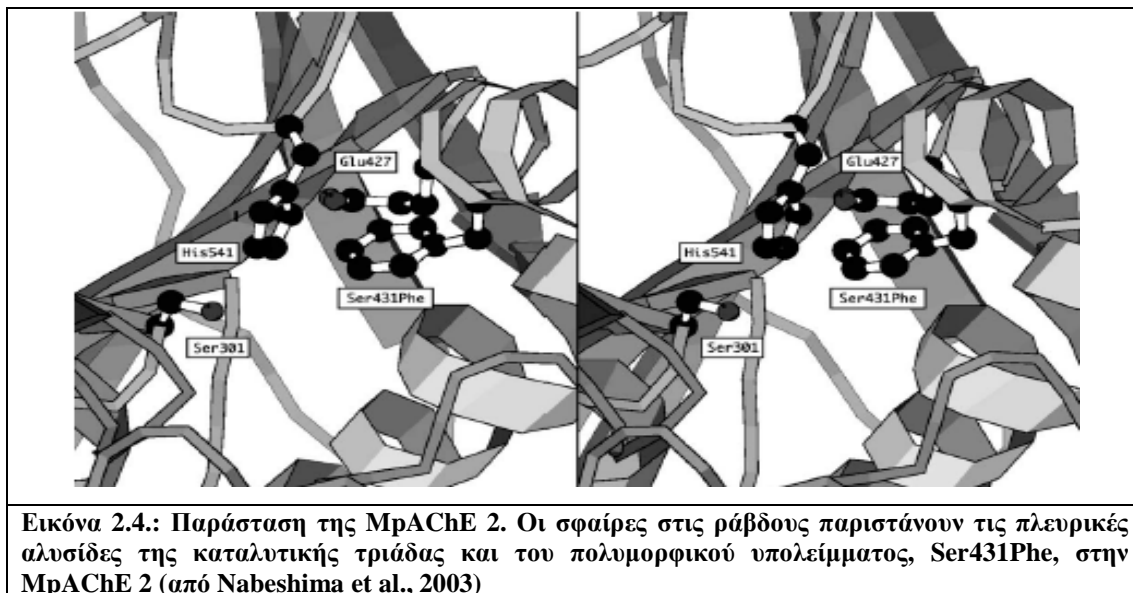
**ακυλική θήκη** (acyl pocket), η οποία αποτελείται από πλευρικές αλυσίδες τρυπτοφάνης, φαινυλαλανίνης και σερίνης με κατεύθυνση εσωτερική προς τη θέση πρόσδεσης (Kono & Tomita, 2006, Sussman et al., 1991, Colletier, 2006).

#### 2.6.1.2.β. Μοριακή βάση της μη ευαισθησίας της ακετυλοχολινεστεράσης

Η μη ευαισθησία της ακετυλοχολινεστεράσης στα οργανοφωσφορικά αναφέρθηκε πρώτα στην περίπτωση για το άκαρι *Tetranychus urticae* και σχετίστηκε με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά (Smmisaert, 1964). Οι βιοχημικές ιδιότητες της μη ευαίσθητης ακετυλοχολινεστεράσης υποδήλωναν μια τροποποίηση που συνέβαινε στην ενεργή πλευρά του ενζύμου (Voss & Matsamura, 1964) και μετέπειτα μελέτες σε είδη *Acarus* έδειξαν τροποποίηση στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (Fournier & Mutero, 1994). Μοριακές μελέτες έδειξαν ότι στα είδη *Brachycera* η μη ευαισθησία της ακετυλοχολινεστεράσης συνοδευόταν από αντικαταστάσεις κάποιων αμινοξέων. Οι αντικαταστάσεις αυτές αναγνωρίστηκαν στην AChE της *D. melanogaster* και της *Musca domestica* αρχικά αλλά δεν αναγνωρίστηκαν εξειδικευμένες μεταλλάξεις για τη μη ευαισθησία σε άλλα ανθεκτικά είδη όπως και για τη *M. persicae* γεγονός που οδήγησε τελικά στην ανακάλυψη ενός δεύτερου τύπου ακετυλοχολινεστεράσης, το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι παράλογο με το γονίδιο που κωδικοποιεί την ακετυλοχολινεστεράση στη *D. melanogaster* (*Ace*). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον δεύτερο τύπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 όταν το γονίδιο που κωδικοποιεί τον πρώτο τύπο ακετυλοχολινεστεράσης ορθόλογου του γονιδίου *Ace* στη δροσόφιλα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (Nabeshima et al, 2003, Kono & Tomita, 2006, Chen, 2007)

Στη *M. persicae* η μη ευαισθησία της ακετυλοχολινεστεράσης οφείλεται σε αντικατάσταση της σερίνης 431 από φαινυλαλανίνη (Ser431Phe). Καθώς η MpAChE1 είναι ομοζυγωτική και το cDNA της MpAChE2 είναι ετεροζυγωτικό, η αντικατάσταση Ser431Phe στην MpAChE2 εξηγεί την ετερογένεια της AChE των ανθεκτικών κλώνων στο pirimicarb. Η αντικατάσταση συμβαίνει στην ακυλική θήκη, η οποία καθορίζει τον προσανατολισμό των συμπλόκων στο ενεργό κέντρο με υδροφοβικούς δεσμούς ελκύοντας και παγιδεύοντας τα σύμπλοκα κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Η τρισδιάστατη δομή των ακετυλοχολινεστερασών με κρυσταλλογραφία με ακτίνες X έδειξε ότι η ακυλική θήκη περιβάλλεται από πλευρικές αλυσίδες από υδροφοβικά αρωματικά αμινοξέα. Όταν κάποιες

αντικαταστάσεις αμινοξέων διαταράσσουν το χώρο και την υδροφοβικότητα της θέσης αυτής, οι ενζυματικές ιδιότητες της ακετυλοχολινεστεράσης τροποποιούνται με εξειδίκευση στο σύμπλοκο.



Η αντικατάσταση της Ser431Phe θεωρείται ότι κάνει την ακυλική θήκη πιο στενή και πιο υδρόφοβη και ακόλουθα μεταβάλλει την προσπέλαση της αλκοξυλικής ομάδας των παρεμποδιστών σε αυτή τη θέση. Επίσης καθώς η φαινυλαλανίνη της ακυλικής θήκης αλληλεπιδρά με την καταλυτική ιστιδίνη π-κατιονικά και επηρεάζει τον προσανατολισμό της ιστιδίνης μεταφέροντας ένα θετικό φορτίο κατά την καταλυτική διαδικασία η απώλεια ενός αρωματικού δακτυλίου κατά την αντικατάσταση Ser431Phe διαταράσσει την π-κατιονική αλληλεπίδραση μεταξύ της ακυλικής θήκης και του καταλυτικού αμινοξέος His541, γεγονός που προκαλεί αλλαγή στην πλευρική αλυσίδα της His541, ώστε να αλλάξει την εξειδίκευση στο σύμπλοκο (Nabeshima et al, 2003, 2004).

Ο τύπος αυτής της ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε σε άτομα της ομάδας της *M. persicae* μετά το 1990 (Moores et al., 1994a) παρά την παρουσία του σε άλλα είδη εντόμων πολύ νωρίτερα, ανιχνεύθηκε πρώτα σε πληθυσμούς στην Ελλάδα και ακολούθησε στην Ιαπωνία και Ν. Αμερική, και πρόσφατα έδειξαν μια βόρεια εξάπλωση στην Ευρωπαϊκή της κατανομή (Moores et al., 1994b). Επειδή ο μηχανισμός αυτός παρατηρήθηκε πρόσφατα και σε σχέση με το μηχανισμό των εστερασών πιστεύεται ότι εξελίχθηκε μετά τις ενισχυμένες εστεράσεις και επειδή και στην E4 (που είναι πιο συχνή στα ανολοκυκλικά και ανδροκυκλικά άτομα) και στην



FE4 (που είναι πιο συχνή στα ολοκυκλικά άτομα) το ίδιο γονίδιο *Ache* υπάρχει, πιθανώς πρωτοεμφανίστηκε σε ολοκυκλικό άτομο και μέσω του συμπλέγματος *M. persicae* - *M. nicotianae* εξαπλώθηκε γενικότερα. Έχει παρατηρηθεί σε ετεροζυγωτική αλλά και ομοζυγωτική κατάσταση και ενώ στην Αγγλία οι αφίδες με το γονίδιο μη ευαισθησίας στην AChE ήταν κόκκινες και είχαν την E4 εστεράση ενισχυμένη, στην Ελλάδα όπου είναι πιο συχνές οι αφίδες με FE4 εστεράση σημειώθηκε και στις πράσινες και στις κόκκινες αφίδες (Devonshire, et al, 1998).

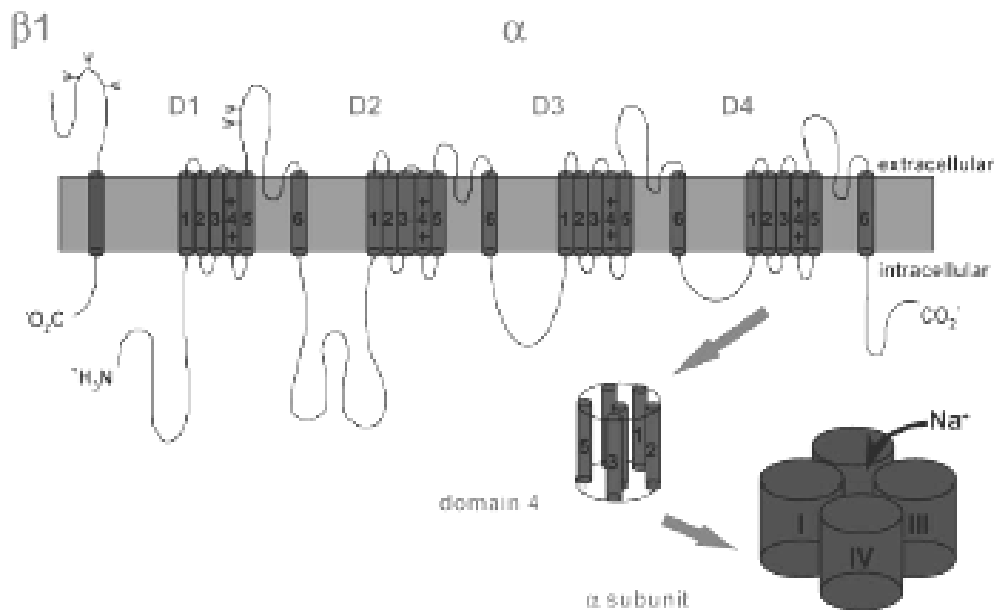
Η μη ευαίσθητη AChE προσδίδει ισχυρή ανθεκτικότητα ειδικά στο pirimicarb και στο triazamate, το τελευταίο όντας ένα νέο και πολύ αποτελεσματικό τριαζολικό αφιδικτόνο (Dewar et al., 1994), το οποίο επίσης παρεμποδίζει την AChE. Και τα δύο είναι N,N-διμεθυλοκαρβαμιδικά. Αντίθετα, σε μια σειρά οργανοφωσφορικών, αρυλικών και oxime N-μονομεθυλοκαρβαμιδικών δε σημειώνεται μη ευαισθησία, γεγονός που σημαίνει ότι οι περισσότεροι αντικαταστάτες του καρβαμιδικού αζώτου είναι σημαντικοί για την έκφραση της ανθεκτικότητας σε αυτό το συγκεκριμένο είδος (Devonshire, et al, 1998).

### **2.6.1.3. Μη ευαισθησία των καναλιών Νατρίου στα εντομοκτόνα (knock down resistance)**

#### **2.6.1.3.α. Δομή και λειτουργία των καναλιών Νατρίου και δράση των εντομοκτόνων σε αυτά.**

Τα κανάλια Νατρίου είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία δυναμικών ενέργειας στα νευρικά κύτταρα. Για να πραγματοποιήσουν το λειτουργικό τους ρόλο, τα κανάλια Νατρίου πρέπει να μπορούν να ολοκληρώσουν τις μεταβάσεις καταστάσεων *in vivo* μεταξύ ανάπαυσης, ανοίγματος και γρήγορης απενεργοποίησης σε λίγα milliseconds ή λιγότερο. Η ελάχιστη αλλαγή των ιόντων Νατρίου μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες στην περατότητα της μεμβράνης γι αυτό το λόγο τα κανάλια Νατρίου είναι πρωτεύων στόχος πολλών νευροτοξικών εντομοκτόνων.

Τα κανάλια Νατρίου περιέχουν μια μεγάλη α-υπομονάδα και μία ή δυο μικρότερες β-υπομονάδες. (Wang & Wang, 2003). Την α-υπομονάδα αποτελεί μια μεγάλη πρωτεΐνη με τέσσερις εσωτερικές ομόλογες περιοχές, όπου κάθε μια περιέχει πολλαπλά α-ελικοειδή διαμεμβρανικά τμήματα. (Catterall, 2000) Οι 4 ομόλογες περιοχές σχηματίζουν μια ψευδοτετραμερή κατασκευή της οποίας το κεντρικό τμήμα είναι ένα μονοπάτι διέλευσης (πόρος) (Wang & Wang, 2003).


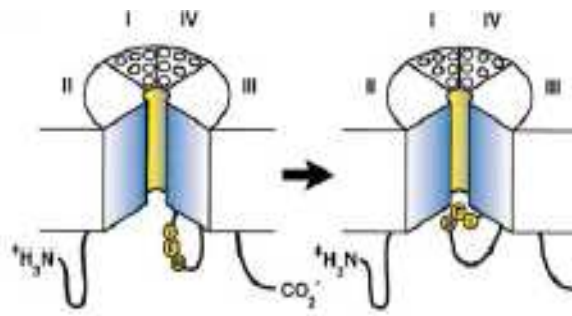


**Εικόνα 2.5.: Απεικόνιση των α και β υπομονάδων του καναλιού Νατρίου. Σημειώνονται τα διαμεμβρανικά τμήματα (S1-S6) και οι ομόλογες περιοχές (D1-D4) μέσα στην α-υπομονάδα (από Wang & Wang, 2003)**

Σε κάθε μία από τις τέσσερις ομόλογες περιοχές τα διαμεμβρανικά τμήματα είναι έξι (S1-S6) και ένας βρόγχος επανεισόδου βυθισμένος στη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων S5-S6 σχηματίζει τον εξωτερικό πόρο. Σχετικά μεγάλοι εξωκυτταρικοί βρόγχοι σε κάθε ομόλογη περιοχή συνδέοντας είτε το S5 ή το S6 διαμεμβρανικό τμήμα με το μεμβρανικό βρόγχο επανεισόδου. Ακόμα μεγαλύτεροι βρόγχοι συνδέουν τις τέσσερις ομόλογες περιοχές και μεγάλες περιοχές με τερματικό N ή C υπάρχουν διακυτταρικά. Οι εκτοκυτταρικές περιοχές των β-υπομονάδων διπλώνουν σαν sandwich με τα δυο φύλλα των β-υπομονάδων να συγκρατούνται με υδροφοβικούς δεσμούς (Catterall, 2000, Wang & Wang, 2003).

Η λειτουργία των καναλιών Νατρίου για τη δημιουργία δυναμικών ενέργειας συνοψίζεται στις τρεις βασικές διαδικασίες: α) ενεργοποίηση που εξαρτάται από το φορτίο, β) ταχεία απενεργοποίηση, γ) επιλεκτική αγωγιμότητα φορτίου. Η **ενεργοποίηση** των καναλιών Νατρίου προέρχεται από την προς τα έξω κίνηση των φορτίων εισόδου ως αντίδραση στις αλλαγές του ηλεκτρικού πεδίου της μεμβράνης. Το S4 διαμεμβρανικό τμήμα λειτουργεί ως αισθητήρας τάσης (διαφοράς δυναμικού) και περιέχει επαναλαμβανόμενα μοτίβα ενός θετικά φορτισμένου αμινοξέος που ακολουθείται από δύο υδροφοβικά υπολείμματα που δημιουργούν μία κυλινδρική α-έλικα με σπειροειδή λωρίδα θετικού φορτίου γύρω από αυτή. Το αρνητικά

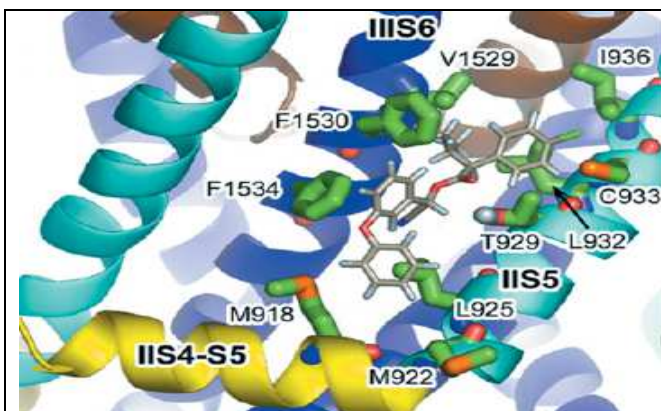
φορτισμένο εσωτερικό ηλεκτρικό πεδίο εξάγει μια ισχυρή δύναμη στα θετικά αυτά φορτία, που παρατάσσονται κατά μήκος της μεμβράνης τραβώντας τα μέσα στο κύτταρο σε θέση διέγερσης. Τα θετικά αυτά φορτία σταθεροποιούνται στο διαμεμβρανικό περιβάλλον σχηματίζοντας ζεύγη με αρνητικά φορτισμένα υπολείμματα από γειτονικά διαμεμβρανικά τμήματα. Η αποπόλωση της μεμβράνης επιτρέπει στα S4 τμήματα να κινηθούν προς τα έξω κατά μήκος του σπειροειδούς μονοπατιού ξεκινώντας μια προσαρμοσμένη αλλαγή που ανοίγει τον πόρο.

	
<p><b>Εικόνα 2.6.:</b> Απεικόνιση των αμινοξέων του S4 τμήματος της IV περιοχής. Με μπλε φαίνονται τα υδροφοβικά υπολείμματα και με κίτρινο τα θετικά φορτισμένα υπολείμματα αργινίνης σε κάθε τρίτη θέση (από Catterwall, 2000)</p>	<p><b>Εικόνα 2.7.:</b> Ο μηχανισμός απενεργοποίησης των καναλιών Νατρίου. Φαίνεται ο βρόγχος που συνδέει της περιοχές III και IV και το σημαντικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη που κλείνει το στόμιο του πόρου (από Catterwall, 2000)</p>

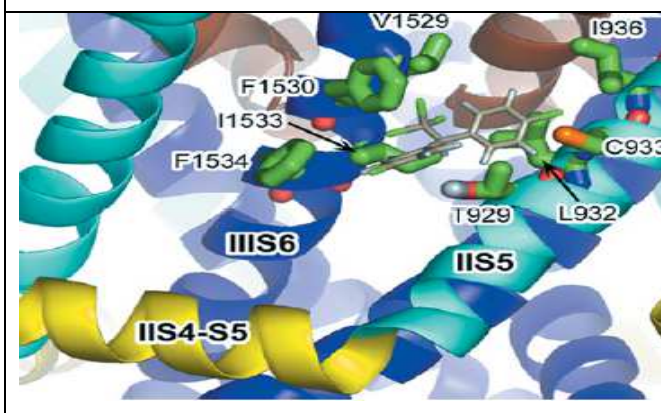
Μέσα σε λίγα milliseconds από το άνοιγμα του πόρου τα κανάλια Νατρίου **απενεργοποιούνται**. Βασισόμενη στην ευαισθησία της σε πρωτεάσες που διεισδύουν στον άξονα η ταχεία απενεργοποίηση μεσολαβείται από μια ενδοκυτταρική πύλη, η οποία προσδένεται στο ενδοκυτταρικό στόμιο του πόρου και απεικονίζεται ως μια σφαίρα δεμένη στην ενδοκυτταρική επιφάνεια του καναλιού με μια εύκαμπτη αλυσίδα. Κατά τη διάρκεια της απενεργοποίησης ο βρόγχος που συνδέει της περιοχές III και IV σχηματίζει μια πύλη απενεργοποίησης η οποία διπλώνει μέσα στην κατασκευή του καναλιού (Vassilev et al., 1988, 1989). Σε αυτή την περιοχή υπάρχει μια υδροφοβική **τριάδα** ισολευκίνης, φαινυλαλανίνης και μεθιονίνης (**IFM**), η οποία είναι κρίσιμη για την ταχεία απενεργοποίηση καθώς λειτουργεί ως ένας προσδεδεμένος παρεμποδιστής που προσδένεται σε ένα υποδοχέα στο ενδοκυτταρικό στόμιο του πόρου. Το αμινοξύ κλειδί φαινυλαλανίνη σχηματίζει υδροφοβικούς δεσμούς με ένα υποδοχέα απενεργοποίησης στην πύλη κατά τη διάρκεια της

απενεργοποίησης (Kellenberg et al., 1997b). Υπολείμματα γλυκίνης και προλίνης, που βρίσκονται πλευρικά της IFM τριάδας λειτουργούν ως μοριακές «κλειδώσεις» που επιτρέπουν το κλείσιμο της πύλης απενεργοποίησης σαν ένα καπάκι. Η θρεονίνη, που βρίσκεται δίπλα από την IFM τριάδα έχει και αυτή σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση καθώς αλληλεπιδρά και αυτή με τον υποδοχέα απενεργοποίησης στον πόρο. Αντίθετα, η μεθειονίνη της IFM τριάδας είναι θαμμένη στην καρδιά του πεπτιδίου και αλληλεπιδρά με δυο τυροσινικά υπολείμματα στην α-έλικα. Αυτή η αλληλεπίδραση σταθεροποιεί το δίπλωμα του πεπτιδίου και εξαναγκάζει τη φαινυλαλανίνη στην εκτεθειμένη θέση της. Η α-έλικα λειτουργεί ως εξέδρα για να παρουσιάσει την IFM τριάδα και τη θρεονίνη σε ένα υποδοχέα στο στόμιο του πόρου καθώς κλείνει η πύλη. (Catterall, 2000).

Και το DDT και τα πυρεθροειδή έχουν όμοια επίδραση στο κανάλι Νατρίου σταθεροποιώντας την ανοικτή κατάσταση, επιβραδύνοντας την αποπόλωση μετά από ένα δυναμικό ενέργειας και δημιουργώντας επαναλαμβανόμενες απελευθερώσεις φορτίου.



Εικόνα 2.8.: Θέσεις πρόσδεσης των πυρεθροειδών στο κανάλι Νατρίου της οικιακής μύγας (από O'Reilly et al., 2006)



Εικόνα 2.9.: Θέσεις πρόσδεσης του DDT στο κανάλι Νατρίου της οικιακής μύγας (από O'Reilly et al., 2006)

Τα σημεία πρόσδεσης των πυρεθροειδών και του DDT είναι η υδροφοβική κοιλότητα που δημιουργείται από τις IIS5 και IIS6 έλικες και τον σύνδεσμο IIS4-S5 στο χαμηλότερο τμήμα. Η κοιλότητα αυτή επιστρώνεται με πλευρικές αλυσίδες από αμινοξέα, στα οποία προσδένονται τα μόρια των εντομοκτόνων. Η πρόσδεση των πυρεθροειδών και του DDT σταθεροποιεί τον II S4-S5 σύνδεσμο και τις IIS5 και IIS6 έλικες (μέσω αλληλεπίδρασης με το όξινο τμήμα). Οι θέσεις πρόσδεσης του DDT σχεδόν ταυτίζονται με αυτή των πυρεθροειδών. Το DDT δεν κάνει επαφή με τη Met918 στον II S4-S5 σύνδεσμο. Οι θέσεις πρόσδεσης των πυρεθροειδών είναι τα αμινοξέα Met918, Thr929, Leu925 και Leu932 (O'Reilly et al., 2006)

#### 2.6.1.3.β. Ρόλος των μεταλλάξεων που προσδίδουν την ανθεκτικότητα

Η αντικατάσταση των αμινοξέων που αποτελούν σημεία πρόσδεσης των εντομοκτόνων σε αυτά είναι ένας από τους μηχανισμούς που υπόκειται η ανθεκτικότητα των εντόμων στα πυρεθροειδή και στο DDT. Στη *M. persicae* η αντικατάσταση της λευκίνης (Leu1014) με φαινυλαλαμίνη (L1014F) προσδίδει ανθεκτικότητα στο DDT και στα πυρεθροειδή παρόλο που βρίσκεται αρκετά μακριά από την κοιλότητα πρόσδεσης. Η μετάλλαξη στη θέση αυτή χαμηλώνει τη συνάφεια των ανοικτών καναλιών για τα πυρεθροειδή στο υπο10-30πλάσιο και μειώνει τη διαθεσιμότητα των καταστάσεων ανοικτών καναλιών λόγω ενίσχυσης της κατάστασης κλειστού καναλιού, περιορίζοντας έτσι τον αριθμό των υψηλής συνάφειας θέσεων πρόσδεσης διαθέσιμων για τα πυρεθροειδή. Ο ακριβής μηχανισμός που εξάγει τέτοια επίδραση δεν είναι ξεκαθαρισμένος αλλά υπάρχουν δυο θεωρίες. Σύμφωνα με την πρώτη το γεγονός ότι βρίσκεται πολύ κοντά με τη θέση σύνδεσης της θύρας σε κάθε έλικα υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να παρεμποδίζουν τις κινήσεις κάμψεις των S6 ελίκων που είναι απαραίτητες για το άνοιγμα του καναλιού κάτι που συμφωνεί με την επίδραση της μετάλλαξης L1014F στην αλλαγή της ισορροπίας προς την κλειστή κατάσταση του καναλιού. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να αλλάζει τη συμπίεση των ελίκων S5 και S6 ώστε να προκαλέσουν μετατόπιση των αμινοξέων στις θέσεις IIS5 και IIS6 που απαιτούνται για την πρόσδεση των εντομοκτόνων. (O'Reilly et al., 2006)

Η αντικατάσταση της μεθειονίνης 918 (Met918) με θυμίνη (M918T), που προσδίδει τη super kdr ανθεκτικότητα επιδρά μόνο στα πυρεθροειδή καθώς το συγκεκριμένο αμινοξύ δεν είναι σημείο πρόσδεσης για το DDT. Η δράση της συγκεκριμένης μετάλλαξης σχετίζεται με την απαλοιφή των πολικών

αλληλεπιδράσεων με τα πυρεθροειδή. (O'Reilly et al., 2006, Martinez-Torres et al., 1999)

#### 2.6.1.3.γ. Συνεισφορά της *kdr* και των εστερασών στη συνολική ανθεκτικότητα στο DDT και στα πυρεθροειδή

Η ανθεκτικότητα στο DDT είναι ανεξάρτητη του επιπέδου της δραστηριότητας των εστερασών και σχετίζεται μόνο με την παρουσία της *kdr* μετάλλαξης καθώς το DDT δεν περιέχει εστερικό δεσμό ώστε να είναι ευαίσθητο στην υδρόλυση από τις εστεράσες. (Martinez-Torres et al., 1999)

Στα πυρεθροειδή και συγκεκριμένα στο deltamethrin η παρουσία της μετάλλαξης στο κανάλι Νατρίου έχει μεγαλύτερη επίδραση στο επίπεδο της ανθεκτικότητας αλλά η E4 εστεράση σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη έχει μία ενισχυτική επίδραση πολλαπλασιάζοντας το συνολικό επίπεδο στο πενταπλάσιο σε R2 κλώνους έως δεκαπενταπλάσιο σε R3 κλώνους (Martinez-Torres et al., 1999).

Ανάλυση κλώνων αφίδων που συλλέχθηκαν σε διάστημα πολλών ετών και εκτράφηκαν στο εργαστήριο έδειξαν ότι αυτός ο μηχανισμός υπήρχε προ πολλού στους πληθυσμούς αλλά αναγνωρίστηκε μόλις έγιναν διαθέσιμες οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι (Devonshire et al., 1998). Στους πληθυσμούς της Αγγλίας ο *kdr* μηχανισμός δείχνει μια ισχυρή σύνδεση ανισορροπίας με την ενίσχυση των γονιδίων E4 αλλά όχι των FE4 που ίσως συνδέεται με τη σχεδόν αποκλειστική χρωμοσωμική τοποθέτηση των E4 γονιδίων σε έναν τόπο στο χρωμόσωμα 3 κοντά στο σημείο τομής της μετατόπισης, ενώ τα ενισχυμένα FE4 γονίδια είναι πιο διεσπαρμένα γύρω από το γένωμα (Blackman et al., 1995, 1996, 1998). Παρ' όλ' αυτά αυτή η σύνδεση του *kdr* μηχανισμού με την ενίσχυση του E4 γονιδίου δεν ισχύει πλήρως έξω από την Αγγλία καθώς σε μια ευρύτερη έρευνα αφίδων από 15 χώρες, 5 από τους 30 κλώνους με ενισχυμένα E4 γονίδια δεν είχαν τον *kdr* μηχανισμό (Field et al., 1997). Δεν είναι γνωστό αν η στενή συσχέτιση του *kdr* μηχανισμού και του E4 αντανακλά μια στενή χρωμοσωμική σύνδεση. Φαίνεται να είναι πιο πιθανό να εμφανίστηκε η *kdr* μετάλλαξη πρώτα σε ένα μετατοπισμένο άτομο με υπερπαραγωγή E4 και να έδωσε στους απογόνους τόσο μεγάλο πλεονέκτημα επιλογής όταν εκτέθηκε σε ευρεία ποικιλία εντομοκτόνων που επιβίωσαν επιλεκτικά και διασπάρθηκαν ευρέως ως κλώνος. Ακολούθως αυτής της υπόθεσης, αρσενικά από αυτόν τον ανδροκυκλικό κλώνο θα πέρασαν την *kdr* μετάλλαξη μέσω της σεξουαλικής φάσης σε κάποιους γονοτύπους που υπερ παρήγαγαν FE4 (Devonshire et al., 1998).

## 2.5. Κόστος στην προσαρμοστικότητα των ανθεκτικών εντόμων

Το κόστος στο fitness είναι αυτό που εμποδίζει την επιβίωση των αφίδων στο περιβάλλον. Αυτό το κόστος σε σχέση με την ανθεκτικότητα βοηθάει στη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων, στα οποία έχει ήδη εμφανιστεί ανθεκτικότητα καθώς τα ανθεκτικά άτομα τείνουν να εκλείπουν καθώς απομακρύνεται η πίεση από το εντομοκτόνο. Κόστος στο fitness της *M. persicae* έχει αναφερθεί από τους Field & Foster (2002) σε πληθυσμούς που μελετήθηκαν από αγρούς στην Αγγλία αφίδων που ήταν ανθεκτικές σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά λόγω της υπερπαραγωγής τους σε εστεράσες για τα προηγούμενα δέκα χρόνια. Η υψηλή χρήση εντομοκτόνων που επέλεγαν για άτομα με υψηλά επίπεδα E4, τα οποία όμως έχαναν το πλεονέκτημα επιβίωσης όταν χαλάρωνε η πίεση από τις συγκεκριμένες οικογένειες εντομοκτόνων. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου υπήρξε μια αλλαγή από τα ψηλά επίπεδα καρβοξυλεστερασών λόγω ενίσχυσης του E4 προς χαμηλότερα επίπεδα λόγω ενισχυμένης FE4. Αυτό συνέπεσε με το γεγονός της ελάττωσης της χρήσης των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων και με την αύξηση στη χρήση των πυρεθροειδών και νεοικοτινοειδών. Παράλληλα, οδήγησε και στην αύξηση των αναστρέψιμων αφίδων, οι οποίες όμως επιλέγονταν ξανά όταν αυξανόταν η χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών (Hick et al., 1996).

Κατά την περίοδο του χειμώνα ο αριθμός των αφίδων με συνδυασμένους μηχανισμούς ανθεκτικότητας εστερασών και MACE μειωνόταν κυρίως όταν δεν εφαρμόζονταν εντομοκτόνα (Foster et al., 2002). Οι Foster et al. (Foster et al., 2003) βρήκαν ότι η ενίσχυση του γονιδίου που προσφέρει μεταβολική ανθεκτικότητα και η μετάλλαξη που προσδίδει την *kdr* ανθεκτικότητα έχουν αρνητικές πλειοτροπικές επιδράσεις στο fitness των αφίδων. Και οι δύο μηχανισμοί ανθεκτικότητας κατέληγαν σε μειωμένη αντίδραση στη φερομόνη συναγερμού. Επίσης, η ενίσχυση των γονιδίων που προσέδιδαν ανθεκτικότητα συσχετίστηκε με μειωμένη τάση για μετακίνηση από τα φθαρμένα φύλλα προς τα φρέσκα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στη Γαλλία οι μεταλλάξεις που προσδίδουν την *kdr* ανθεκτικότητα αυξάνονταν την άνοιξη λόγω της χρήσης πυρεθροειδών ενώ η *rdl* μετάλλαξη μειωνόταν κατά τη διάρκεια του χειμώνα πιθανώς λόγω του κόστους στο fitness που σχετίζεται με τη μετάλλαξη (Guillermud et al., 2003)

Ο *kdr* παράγοντας συχνά εμφανίζεται σε συνδυασμό με την υψηλή E4 παραγωγή στους κλώνους της Αγγλίας. Επειδή η υποκείμενη της *kdr* μετάλλαξη είναι

στο γονίδιο του καναλιού Νατρίου αυτός θα φαινόταν πιο πιθανός παράγοντας που μεσολαβεί στην τροποποιημένη συμπεριφορά υπεύθυνη για τη μειωμένη επιτυχία διαχείμανσης για παράδειγμα μειώνοντας την ευαισθησία του νευρικού συστήματος στο ερέθισμα. Το smellblind μεταλλαγμένο στη *D. melanogaster* παρέχει ένα προηγούμενο για μια τέτοια επίδραση της μετάλλαξης του καναλιού Νατρίου (Lilly et al., 1994).

## 2.7. Μέθοδοι ανίχνευσης της ανθεκτικότητας

Η ευαίσθητη ανίχνευση σπάνιων ανθεκτικών αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό μπορεί να ανιχνευθεί με τις κλασσικές βιοδοκιμές, οι οποίες είτε συνίστανται στην έκθεση των αφίδων σε μια διαγνωστική δόση, που θανατώνει το 99% (LD<sub>99</sub>) (Roush & Millar, 1986) ή με την έκθεσή τους σε ένα εύρος δόσεων του υπό εξέταση εντομοκτόνου και τον υπολογισμό της Μέσης Θανατηφόρας Δόσης (LD<sub>50</sub>). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ανθεκτικότητας των αφίδων σε οικογένειες εντομοκτόνων για τις οποίες ο μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν είναι ακόμα γνωστός. Η εφαρμογή του εντομοκτόνου στον υπό εξέταση πληθυσμό μπορεί να γίνει είτε με τοπική εφαρμογή σε μεμονωμένα άτομα, είτε με την εμφύσηση σε διάλυμα εντομοκτόνου ομάδας ατόμων (dip test) ή φύλλων (leaf dip-test) πάνω στα οποία θα τραφούν τα άτομα Ένα παράδειγμα είναι τα νεονικοτινοειδή, για τα οποία η ανθεκτικότητα καθορίζεται σε δοκιμές αντίδρασης σε δόσεις χρησιμοποιώντας το αντιπροσωπευτικό νεονικοτινοειδές imidacloprid (Foster et al., 2003) ή το νέο εντομοκτόνο pymetrozine (Foster et al., 2002).

Η ανίχνευση βιοχημικών ή μοριακών αλλαγών στις αφίδες μπορεί να χαρακτηρίσει με ακρίβεια άτομα σε ένα πληθυσμό που είναι ανθεκτικά σε μια συγκεκριμένη οικογένεια εντομοκτόνων. Η υπερπαραγωγή καρβοξυλεστερασών ελέγχεται σε μεμονωμένα άτομα με ELISA (Devonshire et al., 1977, Moores et al., 1994 Field et al., 1997). Η δραστηριότητα της τροποποιημένης ακετυλοχολινεστεράσης μπορεί να ελεγχθεί με κινητικές δοκιμές (Moores et al., 1994). Η παρουσία της *kdr* και *super-kdr* ανθεκτικότητας μπορεί να ανιχνευθεί με μια allelic discrimination PCR δοκιμή βασιζόμενη στις μεταλλάξεις L1014F και M918T στην πρωτεΐνη του καναλιού Νατρίου (Martinez-Torres et al., 1999, Foster et al., 2000, Anstead et al., 2004). Έχει επίσης αναπτυχθεί μια μέθοδος ταχείας ανίχνευσης και των δύο μηχανισμών ανθεκτικότητας σε μια μόνο μοριακή δοκιμή



χρησιμοποιώντας προϊόντα RLFP-PCR σε μεμονωμένα άτομα αφίδων ή και ομάδα ατόμων (Casanelli et al., 2005).

## **2.8. Διαχείριση και αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας**

Ο Georgiou (1994) συνέστησε δύο στρατηγικές για τον έλεγχο – διαχείριση της ανθεκτικότητας στις αφίδες:

1) Τροποποίηση της χρήσης των εντομοκτόνων. Μείωση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου - εφαρμοζόμενου εντομοκτόνου με μη συχνές εφαρμογές, χρήση μη υπολειμματικών εντομοκτόνων και συντήρηση των καταφυγίων των αφίδων που μπορεί να αποτελείται από μη ψεκαζόμενα φυτά που μπορούν να αποικίζονται από ευαίσθητες στο εντομοκτόνο αφίδες

2) Πολλαπλή επίθεση. Χρήση διαφόρων παραγόντων ελέγχου που προκαλούν ανεξάρτητη πίεση στις αφίδες. Κάθε παράγοντας πρέπει να λειτουργεί ανεξάρτητα ώστε να επιλέγει για ανθεκτικότητα σε ένα επίπεδο που να μην είναι πιθανό να προκαλέσει εμφάνιση ανθεκτικότητας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με εναλλαγή εντομοκτόνων από διαφορετικές οικογένειες με διαφορετικούς τρόπους δράσης ή με διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Θεωρείται ότι λίγες αφίδες που είναι ανθεκτικές σε μια τάξη εντομοκτόνων έχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε άλλες οικογένειες χημικών εντομοκτόνων. Επιπλέον, η ανθεκτικότητα των αφίδων σε μια συγκεκριμένη οικογένεια εντομοκτόνων θεωρείται ότι καταλήγει σε αφίδες με χαμηλότερο fitness στο περιβάλλον και εκλείπουν όταν το αφιδοκτόνο στο οποίο αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα απομακρυνθεί (Georgiou, 1994).

Η χρήση νέων εντομοκτόνων όπως το pymetrozine, το οποίο δεν έχει δείξει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε άλλες οικογένειες εντομοκτόνων (Foster, 2002) συστήνεται να συμπεριληφθεί σε κάθε στρατηγική ελέγχου της ανθεκτικότητας.

## **2.9. Τρέχουσα κατάσταση της ανθεκτικότητας της *M. persicae* στην Ευρώπη και στην Ελλάδα**

Οι περισσότεροι πληθυσμοί *M. persicae* στην Ευρώπη έχουν ενδιάμεσα επίπεδα ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά, που προκαλείται από το FE4 ένζυμο, και στα πυρεθροειδή που προκαλείται από τα μη ευαίσθητα κανάλια Νατρίου, αντανακλώντας η κατάσταση αυτή την πρόσφατη χρήση εντομοκτόνων. Στην περίοδο από το 1996 μέχρι το 2000 στη Δυτική Ευρώπη παρατηρήθηκε δραματική μείωση των μηχανισμών ανθεκτικότητας MACE και

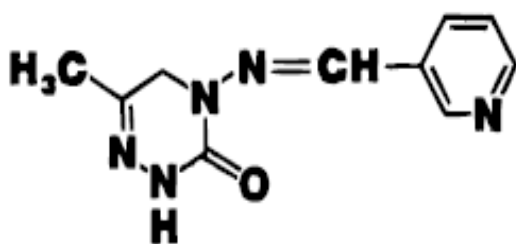
αυξημένων εστερασών, που συνδέθηκε είτε με το υψηλό κόστος στην απόδοση των κλώνων που διαθέτουν αυτούς τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας είτε λόγω της στροφής από τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα προς τα πυρεθροειδή και τα νεονικοτινοειδή, που όμως οδήγησε σε αύξηση της *kdr* ανθεκτικότητας (Foster et al., 2002, Field & Foster, 2002).

Στην Ελλάδα και οι τρεις τύποι ανθεκτικότητας παρατηρούνται σε αυξημένα ποσοστά σε κλώνους που μελετήθηκαν από διάφορες περιοχές της χώρας ανεξάρτητα από τον ξενιστή, από τον οποίο προέρχονταν τα άτομα. Σε σύγκριση με αντίστοιχα ποσοστά ανθεκτικότητας σε μελέτη που έγινε στο διάστημα από το 1998 έως το 2000 (Cox et al., 2004, Margaritopoulos et al., 2007) δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταβολή στα επίπεδα ανθεκτικότητας που σχετίζεται με τη μη ευαίσθητη AChE και τα αυξημένα επίπεδα εστερασών ενώ αντίθετα σημειώθηκε αύξηση στη συχνότητα της *kdr* ανθεκτικότητας, που συνδέεται με την είσοδο των νεονικοτινοειδών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων στην καλλιεργητική πρακτική των Ελλήνων αγροτών. Η διατήρηση των συχνοτήτων της ανθεκτικότητας που συνδέεται με την μη ευαισθησία στην AChE και τις αυξημένες εστεράσες οφείλεται είτε στο μειωμένο κόστος απόδοσης που σχετίζεται με την υψηλή θνησιμότητα των ανθεκτικών κλώνων το χειμώνα καθώς οι χειμώνες στην Ελλάδα είναι ηπιότεροι και οι εγγενώς αναπαραγόμενοι πληθυσμοί διαχειμάζουν με την μορφή ωών, είτε λόγω της προστασίας που προσφέρουν οι καλλιέργειες ροδακινιών στους ολοκυκλικούς πληθυσμούς, είτε λόγω της επιμονής στη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων για το έλεγχο των αφίδων (Margaritopoulos et al., 2007).

### 3. PYMETROZINE

#### 3.1 Γενικά

Το pymetrozine είναι ο πρώτος και μοναδικός εκπρόσωπος μιας νέας οικογένειας εντομοκτόνων των azomethin pyrimidine. Ο ιδιαίτερος τρόπος δράσης του, που δεν έχει κατανοηθεί πλήρως αλλά εντοπίζεται στην παύση της διατροφής των εντόμων λόγω της παρεμπόδιση της διείσδυσης των στίλετων (Harrewjin, 1997) το καθιστά ιδιαίτερα εκλεκτικό. Με το εύρος δράσης τους καλύπτει κυρίως τα μυζητικά έντομα όπως οι αφίδες, οι αλευρώδεις και οι θρίπες (planthoppers) (Fluckiger et al., 1992) χωρίς να επιδρά σε πλήθος φυσικών εχθρών τους (Sechser et al., 2002). Το pymetrozine διαφοροποιείται από τις παραδοσιακές οικογένειες εντομοκτόνων καθώς δεν είναι νευροτοξικό ούτε έχει επιδράσεις κατάρρευσης στα έντομα, τα οποία παραμένουν ζωντανά και δραστήρια αλλά σταματούν να τρέφονται με αποτέλεσμα να επέρχεται ο θάνατος από ασιτία σε λίγες ημέρες (Harrewjin, 1997). Προκαλεί την παύση διατροφής χωρίς να έχει απωθητικές ή αντιτροφικές ιδιότητες.



Εικόνα3.1: Η χημική δομή του pymetrozine

Η ισχυρή εκλεκτικότητά του, που προστατεύει τους φυσικούς εχθρούς, ο νέος τρόπος δράσης που μειώνει την πίεση επιλογής σε ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς ανθεκτικότητας και μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (Bolsinger et al., 1995) και η ασφάλεια που παρέχει στο περιβάλλον με τη χαμηλή υπολειμματικότητά του, του προσδίδουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για την ένταξή του σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών (Sechser et al., 2002). Η επίδρασή του στη διαδικασία διατροφής επηρεάζει παράλληλα και την ικανότητα των αφίδων αλλά και άλλων μυζητικών εντόμων μετάδοσης ιώσεων (Mowry, 2005, Bextine et al., 2004, Bedford et al., 1998)

### 3.1.1. Φυσικές και χημικές ιδιότητες του pymetrozine

Το pymetrozine είναι στερεό, λευκού ως υπόλευκου χρώματος με ελαφρά γλυκιά οσμή. Έχει σημείο τήξης στους 217° C και ειδικό βάρος 1,36 gr/cm<sup>3</sup>. Με πίεση ατμών μικρότερη από 4x10<sup>-6</sup> Pa θεωρείται ως μη πτητική ουσία υπό συνθήκες αγρού ενώ παράλληλα δεν είναι πτητικό από υγρά εδάφη και υδατικές επιφάνειες. Έχει δυνατότητα για φωτομετατροπή υπό περιβαλλοντικές συνθήκες ενώ είναι πολύ διαλυτό στο νερό με pH σε περιβαλλοντικές συνθήκες και επομένως είναι δυνατή η αποστράγγισή του στα εδάφη και η μεταφορά του στα επιφανειακά νερά απορροής (επιφανειακή μετακίνηση). Τέλος, το pymetrozine έχει αμελητέα δυνατότητα για βιοσυσσώρευση ή βιοσυγκέντρωση στους οργανισμούς.

### 3.1.2. Μετακίνηση του pymetrozine στους φυτικούς ιστούς

Η διασυστηματική ιδιότητα του pymetrozine οφείλεται στη μετακίνησή του όχι μόνο στο ξύλωμα αλλά και στο φλοίομα. Η μετακίνησή του στο φλοίομα εξασφαλίζει την προστασία αναπτυσσόμενων τμημάτων του φυτού που δεν έχουν δεχθεί μεταχείριση (Wyss & Bolsinger, 1997a).

Η κατανομή της δραστικής ουσίας εξαρτάται από τα φυτικά είδη στα οποία εφαρμόζεται διαφοροποιώντας την αποτελεσματικότητά της στα έντομα. Έτσι, το pymetrozine μπορεί να ανιχνευθεί είτε στον ενδοκυτταρικό είτε στον διακυτταρικό χώρο. Η διακυτταρική παρουσία του pymetrozine είναι σημαντική καθώς η διείσδυση των στιλέτων των αφίδων γίνεται στο διακυτταρικό χώρο του φύλλου. Επομένως οι αφίδες είναι δυνατόν να συναντήσουν τη δραστική ουσία πριν καν φτάσουν στην τελική θέση διατροφής (Wyss & Bolsinger, 1997b).

Η εφαρμογή του από εδάφους παρουσιάζει διαφορές στην απορρόφηση και κινητικότητα του λόγω μάλλον του τύπου του εδάφους χωρίς όμως να επιδρά στη δραστηριότητά του στο φυτό. Σε αυτού του είδους την εφαρμογή όμως σημαντικό ρόλο στην απόδοση του pymetrozine παίζει η φυσιολογική ηλικία του φυτού κάτι που δεν ισχύει στην περίπτωση της φυλλικής εφαρμογής, όπου σημαντικό ρόλο παίζει το είδος του φυτού (Wyss & Bolsinger, 1997b).

Το pymetrozine αποδομείται στο φύλλο με ημίσεια ζωή περίπου τρεις μέρες και οι μεταβολίτες του είναι βιολογικά μη ενεργοί ή πολύ ασταθείς (Wyss & Bolsinger, 1997b). Η αποδόμησή του στη θέση πρόσληψής του από το έντομο δε συμβαίνει με τον ίδιο ρυθμό, όπως σε άλλες περιοχές, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε σε μια χαμηλότερη καταβολική δραστηριότητα στη συγκεκριμένη

θέση είτε στο συνεχή ανεφοδιασμό του από τις περιβάλλουσες περιοχές (Wyss & Bolsinger, 1997b).

Η αποδόμηση του pymetrozine στο έδαφος εξαρτάται κυρίως από τη βιολογική δραστηριότητα και το pH και η ημίσεια ζωή του κυμαίνεται από τρεις μέρες στα βιολογικά ενεργά εδάφη έως 33 μέρες στα αποστειρωμένα αερόβια εδάφη με τιμή του pH ίση με 7 (Gonzales-Valero, 1993)

### **3.2. Τρόπος δράσης του pymetrozine**

Στις αφίδες, όπως και σε άλλα νήσσοντα μυζητικά έντομα όπως οι αλευρώδεις, η εφαρμογή του pymetrozine εμπλέκεται με τη διαδικασία διατροφής τους και οδηγεί σε θάνατο λόγω ασιτίας, χωρίς να εμφανίζουν τα κλασσικά συμπτώματα νευρικής τοξικότητας, όπως παράλυση. Δεν υπάρχουν αντιτροφικές ή απωθητικές επιδράσεις, που να μπορούσαν να εξηγήσουν την παρεμπόδιση της διατροφής. Μετά την πρόσληψη του pymetrozine η αφίδες μπορούσαν να περπατούν σχεδόν κανονικά μέχρι το θάνατό τους από ασιτία

Με τη βοήθεια της τεχνικής άμεσης καταγραφής της διατροφικής συμπεριφοράς σε αφίδες ο Harrewijn (1997) παρατήρησε ότι το pymetrozine επιδρά αμέσως μετά την πρόσληψή του από το έντομο εμποδίζοντας την είσοδο των στυλέτων στο φυτικό αγγειακό σύστημα ή τερματίζοντας την αναρρόφηση ανάλογα με την κατάσταση διατροφής. Πιο συγκεκριμένα τα EPGs που παρήχθησαν μετά την πρόσληψη από τα έντομα του pymetrozine έδειξαν κανονική ακολουθία των μοτίβων και των E2 κυμάτων, όμως τα E2 κύματα, που αντανακλούν την πρόσληψη του χυμού, δε διατηρούνταν και οι αφίδες είτε μετέβαιναν από το E2 στο C μοτίβο ή απέσυραν εντελώς τα στυλέτα. Η πιο σημαντική επίδραση του pymetrozine φάνηκε να είναι στους cibarial διασταλτικούς μύες που δέχονται νεύρα από το μετωπικό γάγγλιο, προκαλώντας άμεση διακοπή της διατροφής. Καθώς οι επιδράσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των E2 κυμάτων (πρόσληψη χυμού) ήταν: α) η αυξημένη μη κανονικότητα και μειωμένο εύρος των E2 κυμάτων και β) η μειωμένη συχνότητα και εύρος των E2 κορυφών. Το pymetrozine φαίνεται να επιδρά στη δραστηριότητα των cibarial βαλβίδων, στην τροφική αντλία και στην αντλία σιέλου. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδήλωναν την ύπαρξη ενός νέου νευρικού μηχανισμού στόχου του pymetrozine (Harrewijn, 1997)

Το 2004 οι Kaufmann και συνεργάτες μελετώντας τις επιδράσεις του pymetrozine σε αφίδες αλλά και σε ακρίδες, που παρά την αυξημένη εκλεκτικότητα

της ουσίας και αυτές έδειξαν συμπτώματα τοξικότητας και παύση της διατροφής. Όπως στα έντομα στόχους του pymetrozine, οι ερευνητές παρατήρησαν μια συνεργιστική δράση του pymetrozine με τη σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη – 5-HT), η οποία και αυτή εμπλέκεται με πολλούς τρόπους στη διαδικασία διατροφής των φυτοφάγων εντόμων, όπως η παραγωγή σιέλου και η έκκριση. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που έγιναν σε διάφορα έντομα υποδηλώνουν ότι η 5-HT δρα απ' ευθείας στα κινητικά νεύρα ρυθμίζοντας τη συναπτική μετάδοση και βρίσκεται σε διάφορα μέρη του νευρικού συστήματος. Το περιφερειακό νευρικό σύστημα, μέρος του οποίου είναι και η σεροτονίνη, θεωρείται ότι ρυθμίζει την κίνηση των στοματικών μορίων κατά τη διάρκεια της διατροφής και τον σιελογόνο αδέν. Άλλες δράσεις που εμπλέκονται με τη διατροφή τοποθετούνται στο μετωπικό γάγγλιο, που είναι μέρος του στοματογαστρικού νευρικού συστήματος και περιέχει σεροτονεργικά νεύρα. Στις αφίδες ο ρόλος των νεύρων του διατροφικού εξοπλισμού καθώς και ο ρόλος της σεροτονίνης δεν είναι τόσο κατανοητός παρόλο που η σχετική ανατομία και φυσιολογία είναι γνωστή με περισσότερες λεπτομέρειες. Η δράση της σεροτονίνης φάνηκε να είναι όμοια με αυτή του pymetrozine, πολύ πιο αδύναμη όμως, καθώς η σεροτονίνη απενεργοποιείται ταχέως μέσω N-ακετυλίωσης ή επαναπρόσληψης, όπως συμβαίνει με τις άλλες βιοαμίνες, μηχανισμοί που και οι δύο δεν έχουν καμία επίδραση στο pymetrozine. Πιο συγκεκριμένα η σεροτονίνη μιμείται τη δράση του pymetrozine παρεμποδίζοντας τη διείσδυση των στιλέτων και την προσρόφηση του χυμού (μειωμένη συχνότητα των κυμάτων E2 και μικρό εύρος των E2 κορυφών) παρόλο που παρατηρείται ταχεία ανάκαμψη από την επίδραση της αμίνης μέσω της δράσης των ανταγωνιστών της σεροτονίνης. Η δράση του pymetrozine ενισχύεται από τη σεροτονίνη και το αντίστροφο και επομένως μιλάμε για σεροτονεργικό τρόπο δράσης του pymetrozine. Στη *L. migratoria* η δράση και των δυο ουσιών απαιτούσε την παρουσία των (ingluvial) γαγγλίων, τα οποία λειτουργούν ως αυτόνομα κέντρα για τον έλεγχο της κινητικότητας του εντέρου και είναι απαραίτητα για την περίσταση. Στις αφίδες η κίνηση των στιλέτων και η δράση των σιελογόνων αδένων καθορίζονται από το υποοισοφαγικό γάγγλιο από το οποίο δέχονται τα νεύρα τα συγκεκριμένα όργανα, επομένως, η επίδραση στην κίνηση των στιλέτων ή τη σιέλωση μπορεί να οφείλεται σε δράση στο υποοισοφαγικό γάγγλιο. Επίσης, κάποιοι διασταλτικοί μύες της φαρυγγικής αντλίας δέχονται νεύρα από το μετωπικό γάγγλιο και κάποιοι από τα χειλικά νεύρα από τον τριτεγκέφαλο. Άρα, η επίδραση του pymetrozine στους διασταλτικούς μύες μπορεί να ανάγεται σε δράση του στον

τριτεγκέφαλο. Καταλήγοντας ο Kaufmann και οι συνεργάτες στη συγκεκριμένη εργασία υπέθεσαν ότι γενικά το pymetrozine είναι ένας δυνατός συνεργιστής μηχανισμών που λειτουργούν στον έλεγχο της ανάδρασης της πρόσληψης της διατροφής που βρίσκονται στον τριτεγκέφαλο και στο υποοισοφαγικό γάγγλιο (Kaufmann, 2004).

Η Ausborn και οι συνεργάτες της μελετώντας επίσης τις επιδράσεις του pymetrozine στη *L. migratoria*, περιορίστηκαν στην ενδελεχέστερη μελέτη ενός άλλου συμπτώματος που παρατήρησε και ο Kaufmann. Το σήκωμα και η έκταση των μεσαίων ποδιών της ακρίδας. Η μελέτη αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αντίθετα με την αρχική υπόθεση, ότι το pymetrozine δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο πρωταρχικός στόχος δράσης του εντομοκτόνου είναι τα χορδοτονικά όργανα όχι μόνο του μηρού τα οποία ανιχνεύουν τη θέση του συνδέσμου και την κίνηση και ήταν υπεύθυνα για τα συμπτώματα που παρατήρησαν αλλά γενικότερα τα χορδοτονικά αισθητήρια όργανα του εντόμου όχι όμως άλλα μηχανοδεκτικά αισθητήρια. Η ομάδα αυτή των ερευνητών δεν αποκλείει άλλες θέσεις στόχους που μπορεί να έχει η δραστική ουσία, όπως μεμβράνες, το όργανο του Johnston ή οι βάσεις των κεραιών (Ausborn, et al., 2005).

### 3.3. Χρήση του pymetrozine στην Ελλάδα

Το pymetrozine πήρε την πρώτη προσωρινή έγκριση για κυκλοφορία στην Ελλάδα στις 2/6/1999 και τη πρώτη οριστική στις 27/2/2002 ως σκεύασμα βρέξιμης σκόνης συγκέντρωσης 25% β/β σε δραστική ουσία για την καταπολέμηση της αφίδας *Aphis gossypii* στην καλλιέργεια του βαμβακιού, και της *M. persicae* στα ροδάκινα και στον καπνό. Στις 30/4/2004 εγκρίθηκε η κυκλοφορία του σκευάσματος σε μορφή βρέξιμων κόκκων σε συγκέντρωση 50% β/β σε δραστική ουσία για την καταπολέμηση, πέρα των προαναφερθέντων, των αφίδων *Aphis citricola*, *Aphis gossypii*, *Toxoptera aurantii*, *M. persicae* σε καλλιέργειας πορτοκαλιάς, της αφίδας *A. gossypii* και των αλευρωδών *Trialeuroides vaporariorum*, *Bemisia tabaci* σε καλλιέργειες τομάτας, πιπεριάς, μελιτζάνας, αγγουριού και πεπονιού.

Έγινε ιδιαίτερη προσπάθεια ένταξης της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας σε προγράμματα ελέγχου των παραπάνω εχθρών στις παραπάνω καλλιέργειες κυρίως λόγω της συμβατότητας των ιδιοτήτων του pymetrozine (φιλικό στο περιβάλλον και στους φυσικούς εχθρούς) με προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών καλλιεργειών. Δε βρήκε όμως αντίστοιχη ανταπόκριση από τους παραγωγούς σε

ορισμένες καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, στην καλλιέργεια του καπνού το pymetrozine δεν προκαλεί ακαριαίο θάνατο στις αφίδες αλλά τους επιτρέπει να ζουν και να είναι δραστήριες μέχρι να πεθάνουν από ασитία σε ένα διάστημα έως και τέσσερις ημέρες από της εφαρμογή. Αυτό σημαίνει ότι τα φυτά δεν απαλλάσσονται από τους μύκητες καπνιάς που συνοδεύουν την εμφάνιση των μελιτωδών εκκριμάτων των αφίδων στα φύλλα του φυτού γεγονός που οδηγεί στην υποβάθμιση της ποιότητας των φύλλων του καπνού. Σε καλλιέργειες ροδακίνων στις περιοχές της Μακεδονίας και κυρίως στους νομούς Πέλλας και Ημαθίας, το pymetrozine χρησιμοποιείται από τους παραγωγούς αλλά όχι στον ίδιο βαθμό με άλλα αφιδοκτόνα, όπως για παράδειγμα τα νεονικοτινοειδή (κυρίως μετά την κυκλοφορία νέων νεονικοτινοειδών με εφαρμογή από εδάφους), λόγω της καθυστέρησης στην εμφάνιση των αποτελεσμάτων. Στην περιοχή της Θεσσαλίας η χρήση του pymetrozine είναι ελάχιστη ενώ στην Πελοπόννησο χρησιμοποιείται κυρίως στο νομό Ηλείας και Μεσσηνίας σε καλλιέργειες καρπουζιών και σε θερμοκήπια. Αντίστοιχα και στην Κρήτη (Ιεράπετρα- νομός Λασιθίου) το pymetrozine αποτελεί σημαντικό όπλο σε καλλιέργειες κηπευτικών και σε θερμοκήπια εναντίον των αλευρωδών λόγω της αυξημένης ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει τα έντομα σε άλλες δραστικές ουσίες (προσωπική επικοινωνία με κύριο Σταύρο Παραγυιού, product manager της Syngenta Hellas).

Αν και διστακτική ακόμα η χρήση του pymetrozine, τα πλεονεκτήματά του, όπως η προστασία των ωφέλιμων, η μικρή υπολειμματική διάρκεια, η δυνατότητα εφαρμογής είτε στο φύλλωμα είτε από εδάφους, το καθιστά ιδιαίτερα προτιμητέο σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών, σε συνδυασμό με άλλες δραστικές ουσίες κυρίως, όπου τα προβλήματα από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι μεγάλα.



## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### 4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σύνθετος βιολογικός κύκλος της *M. persicae* και το χαρακτηριστικό της ετεροοικίας που ευνοούν την παρουσία του για μεγάλη περίοδο κατά τη διάρκεια του έτους και σε μεγάλο εύρος ξενιστών καθώς και η φύση της ζημιάς που προκαλεί είτε άμεσα είτε έμμεσα ως φορέας ιών καθιστούν τη *M. persicae* ως ένα από τους πιο σημαντικούς οικονομικούς εχθρούς σημαντικών εμπορικών καλλιεργειών όπως καπνός, πατάτα, κηπευτικά και άλλα με αποτέλεσμα να έχει τύχει έντονης μεταχείρισης με τα χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η συχνή και εκτεταμένη χρήση των χημικών μέσων οδήγησε στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας στις περισσότερες οικογένειες φυτοπροστατευτικών καθώς η αφίδα έχει αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Στην Ελλάδα η αντιμετώπιση της αφίδας στηρίχθηκε στη χρήση οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων ενώ τα τελευταία χρόνια εισήχθησαν και άλλες ομάδες όπως τα νεονικοτινοειδή τα οποία αντικατέστησαν σε ευρεία κλίμακα τις παλαιότερες ομάδες εντομοκτόνων καθώς το 2003 το 45% περίπου των αφιδοκτόνων αποτέλεσαν τα νεονικοτινοειδή (Margaritopoulos et al., 2007).

Στην Ελλάδα το έντομο έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα στις περισσότερες ομάδες αφιδοκτόνων. Ο μηχανισμός της υπερπαραγωγής των E4/FE4 ενζύμων προσδίδει ευρέου φάσματος ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά, καρβαμικά και ορισμένα πυρεθροειδή (Field et al., 1998, Foster et al., 2000). Η παρουσία της μη ευαίσθητης ακετυλοχολινεστεράσης στα άτομα της *M. persicae* τα κατέστησε ανθεκτικά στα διμεθυλοκαρβαμικά (Moore et al., 1994), ενώ η *kdr* ανθεκτικότητα μείωσε της αποτελεσματικότητα των πυρεθροειδών (Martinez-Torres et al., 1997, 1999). Παλαιότερη έρευνα που παραγματοποιήθηκε το διάστημα 1998-2000 αφορούσε στα επίπεδα ανθεκτικότητας που είχαν αναπτύξει οι αφίδες στην Ελλάδα έδειχναν την ανάπτυξη όλων των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα για τους μηχανισμούς των εστερασών και MACE και πολύ σπάνια για τον *kdr* μηχανισμό σε κλώνους που συλλέχθηκαν κυρίως από τη Βόρεια Ελλάδα (Cox et al., 2001), ενώ νεότερη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 2004-2006 έδειξε διατήρηση των υψηλών επιπέδων ανθεκτικότητας με αύξηση στη συχνότητα της *kdr* μετάλλαξης. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα των αφίδων που είχαν αυξημένα επίπεδα εστερασών ξεπερνούσε το 50% και σε πολλές περιπτώσεις έφτανε και το 80-100% ενώ ένα 85,7% και 89,9% των εξεταζόμενων κλώνων είχαν

μη ευαίσθητη AChE και την *kdr* μετάλλαξη (Margaritopoulos et al., 2007). Αντίστοιχες μελέτες στη Βόρεια Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα στην Αγγλία έδειχναν υποχώρηση των συχνοτήτων ανθεκτικότητας που βασίζονταν στους μηχανισμούς των αυξημένων εστερασών και της τροποποιημένης AChE και αύξηση της *kdr* ανθεκτικότητας (Foster et al., 2002, Field et al., 2002). Η *M. persicae* δεν έχει εμφανίσει ακόμα ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται ήδη για πάνω από μια δεκαετία στην Ελλάδα. Προηγούμενες όμως μελέτες, σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, έχουν υπογραμμίσει την ανάπτυξη χαμηλού ποσοστού ανοχής του εντόμου στα νεονικοτινοειδή (Foster et al., 2003, Margaritopoulos et al., 2007) γεγονός ανησυχητικό εάν λάβουμε υπ'όψη την εντατικότερη χρήση των τελευταίων.

Στα πλαίσια υιοθέτησης στρατηγικών ελέγχου των εχθρών των καλλιεργειών περισσότερο συμβατών με το περιβάλλον αλλά και με προοπτική αντιμετώπισης του φαινομένου της ανθεκτικότητας, στο χημικό οπλοστάσιο έχει προστεθεί και το pymetrozine. Η δραστική αυτή ουσία θεωρείται αντιτροφικό, που όμως δεν έχει απωθητικές ή αντιτροφικές ιδιότητες, αλλά επεμβαίνει στη διαδικασία διατροφής και πιο συγκεκριμένα στη διείσδυση των στιλέτων στο φυτό με αποτέλεσμα το έντομο να πεθαίνει μετά από τρεις με τέσσερις μέρες από αστία (Harrewjin, 1997, Fluckiger et al., 1992). Ο ιδιαίτερος τρόπος δράσης του pymetrozine, που δε συμπίπτει με τους αντίστοιχους των έως τώρα χρησιμοποιούμενων ομάδων εντομοκτόνων, μειώνει τις πιθανότητες εμφάνισης διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Παρ'όλ'αυτά, η εμπειρία από την εξέλιξη της ανθεκτικότητας στην πλειοψηφία των χημικών μέσων υπογραμμίζει την αναγκαιότητα της παρακολούθησης του φαινομένου σε κάθε δραστική ουσία.

## 5. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις περισσότερες ομάδες εντομοκτόνων καθιστά αναγκαία την παρακολούθησή της σε κάθε νέο εντομοκτόνο που εντάσσεται στα διάφορα προγράμματα παρακολούθησης των εχθρών καλλιεργειών. Το pymetrozine είναι μια νέα σχετικά δραστική ουσία που έχει ενταχθεί σε προγράμματα ελέγχου αφίδων τα τελευταία επτά χρόνια στην Ελλάδα. Έως σήμερα δεν έχουν γίνει ιδιαίτερες μελέτες για την παρακολούθηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη δραστική ουσία. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανθεκτικότητας της αφίδας *M. persicae* στο pymetrozine και της επίδρασης της χρήσης του στην περαιτέρω επιβίωση καθώς και στην αναπαραγωγική ικανότητα των ατόμων που επιβίωσαν της εφαρμογής με το εντομοκτόνο. Για τον έλεγχο της ανάπτυξης ανθεκτικότητας, μελετήθηκε η θνησιμότητα που σημειώθηκε στα άτομα διαφόρων κλώνων, που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και από τη Χιλή, και υποβλήθηκαν σε βιοδοκιμές εμβάπτισης φύλλων σε διαφορετικές δόσεις. Με τη μελέτη της περαιτέρω θνησιμότητας στα άτομα που επιβίωσαν των εφαρμοζόμενων δόσεων εντομοκτόνου εξετάστηκε η επίδραση του pymetrozine στην ικανότητα επιβίωσής των αφίδων, ενώ με τον υπολογισμό του δείκτη του ενδογενή ρυθμού ανάπτυξης ( $r_m$ ) μελετήθηκε η επίδραση του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα των αφίδων.

## 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.1. Πειραματικό Υλικό

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 13 κλώνοι της *M. persicae*, δώδεκα από τους οποίους συλλέχθηκαν στην Ελλάδα και ένας στη Χιλή. Η συλλογή των κλώνων στην Ελλάδα έγινε σε έξι διαφορετικές περιοχές (Μελίκη Ημαθίας, Καρδίτσα, Λεχώνια Μαγνησίας, Κατερίνη, Ναύπλιο και Κοζάνη) οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε περιοχές της Βόρειας (Κατερίνη, Κοζάνη, Μελίκη Ημαθίας), Κεντρικής (Καρδίτσα, Λεχώνια Μαγνησίας) και Νότιας (Ναύπλιο) Ελλάδας.

Πιο αναλυτικά οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι όπως φαίνονται στον πίνακα 6.1. :

**Πίνακας 6.1.:** Συνολικά οι κλώνοι με περιγραφή του χρώματος, του ξενιστή, του βιολογικού κύκλου, της ημερομηνίας και περιοχής συλλογής (GR:πράσινο, R:κόκκινο, AN: ανολοκυκλικός, H: ολοκυκλικός)

Όνομα κλώνου	χρώμα	Ημερομηνία συλλογής	Περιοχή συλλογής	Ξενιστής	Βιολ. Κύκλος
06MelT60	GR	19/8/2006	Μελίκη	Καπνός	AN
06LehP68	GR	13/5/2006	Λεχώνια	Ροδάκινο	H
06KatT78	R	8/7/2006	Κατερίνη	Καπνός	AN
06NauP28	GR	24/4/2006	Ναύπλιο	Καπνός	AN
El Molle	R	23/9/2005	Χιλή	Ζιζάνιο	AN
06MelP67	GR	7/5/2006	Μελίκη	Ροδάκινο	AN
06KozP09	GR	2/7/2006	Κοζάνη	Ροδάκινο	H
06KatT94	R	15/7/2006	Κατερίνη	Καπνός	AN
06KozP26	GR	10/9/2006	Κοζάνη	Ροδάκινο	H
05KarT51	R	31/7/2005	Καρδίτσα	Καπνός	AN
05KarT13	R	8/7/2005	Καρδίτσα	Καπνός	AN
05MelT11	GR	7/6/2005	Μελίκη	Καπνός	AN
05MelP40	GR	14/5/2005	Μελίκη	Ροδάκινο	H

Οι ξενιστές από τους οποίους συλλέχθηκαν οι κλώνοι ήταν καλλιέργειες ροδακινιάς και καπνού. Η εξέταση της ανθεκτικότητας των κλώνων αυτών στο

εντομοκτόνο pymetrozine έγινε σε εύρος δόσεων από 0,5859 mg/lit έως 75 mg/lit δραστικής ουσίας διαλυμάτων pymetrozine.

## 6.2. Μέθοδος δειγματοληψίας και διατήρηση των κλώνων

Η συλλογή του πειραματικού υλικού πραγματοποιήθηκε την Άνοιξη (τέλη Απριλίου έως μέσα Ιουνίου) σε καλλιέργειες ροδακινιών και το Καλοκαίρι (μέσα Ιουνίου έως τέλη Αυγούστου) σε καλλιέργειες καπνού. Από κάθε αγροτεμάχιο συλλέχθηκαν 25 δείγματα με κάθε δείγμα να περιλαμβάνει στην περίπτωση των ροδάκινων πληθυσμό από ένα μόνο δένδρο ενώ στην περίπτωση του καπνού πληθυσμό από δύο με τρία γειτονικά φυτά. Τα δείγματα τυλιγμένα σε απορροφητικό χαρτί τοποθετήθηκαν αμέσως μετά τη συλλογή τους σε αεροστεγές σακουλάκι δειγματοληψίας και στη συνέχεια τα σακουλάκια τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο μικρού μεγέθους που περιείχε επιπλέον παγοκύστες για την καλύτερη διατήρηση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους από το σημείο δειγματοληψίας έως το εργαστήριο, όπου τοποθετήθηκαν σειρές σε βιοκλιματικούς θαλάμους. Η δειγματοληψία των κλώνων από τις περιοχές της Ελλάδας πραγματοποιήθηκε από τον υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου της Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σκούρα Παναγιώτη, ενώ ο κλώνος από τη Χιλή συλλέχθηκε από το Διδάκτορα του Εργαστηρίου της Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μαργαριτόπουλο Ιωάννη.

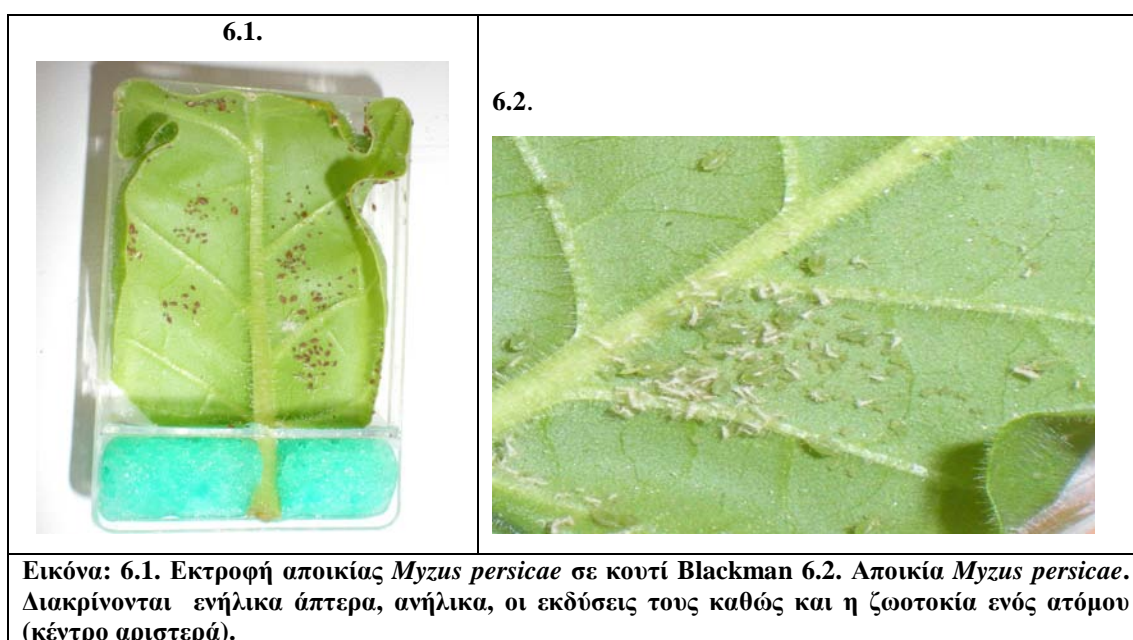
Η εκτροφή έγινε σε φύλλα κινέζικου λάχανου. Τοποθετήθηκε μια παρθενογενετική ενήλικη αφίδα στην κάτω επιφάνεια φύλλου (*Brassica napus* L var. *chinensis* cv Tip-Top) σε κουτί εκτροφής αφίδων (Blackman, 1971). Το κουτί αυτό (Εικόνα 6.1, 6.3) είναι διατάσεων 7,7cm x 4,5cm x 2cm και χωρίζεται σε δυο διαμερίσματα με μια εγκάρσια επιφάνεια, η οποία φέρει οπή στο κέντρο, με το κατώτερο τμήμα να αποτελεί το ¼ σχεδόν του συνόλου. Στο τμήμα αυτό τοποθετήθηκε τεμάχιο σπόγγου ενώ στο ανώτερο τμήμα τοποθετήθηκε φύλλο με το μίσχο να διαπερνάει μέσω της οπής το κατώτερο τμήμα ώστε να έρχεται σε άμεση επαφή και να περιβάλλεται από τον σπόγγο που υπάρχει σε αυτό. Με αυτό τον τρόπο καθώς κάθε κουτί τοποθετείται κατακόρυφα με μια ελαφρά κλίση σε δίσκο με νερό επιτυγχάνεται η συνεχής διαβροχή του σπόγγου και άρα η ενυδάτωση του φύλλου ώστε να διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ενώ παράλληλα δημιουργούνται συνθήκες απομόνωσης με το υδάτινο μέσο να εμποδίζει τυχόν μόλυνση από περιπλανώμενες αφίδες. Η άνω επιφάνεια του κουτιού αποτελεί και το

αποσπώμενο κάλυμμά του, ενώ και στις δυο επιφάνειες έχουν ανοιχτεί οπές διαμέτρου 3,5 cm οι οποίες καλύπτονται από εντομοστεγή σε αφίδες μουσελίνα για να εξασφαλιστεί ο αερισμός του κουτιού. Τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε βιοκλιματικούς θαλάμους (Εικόνα 6.3) σε θερμοκρασία  $15 \pm 1$  °C και φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκότους.

Για την εξασφάλιση υλικού διατροφής των αφίδων υψηλής θρεπτικής κατάστασης και συνθήκες διαβίωσης τέτοιες που να μην επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους τα φύλλα αντικαθιστούνταν κάθε τρεις ημέρες με ταυτόχρονη μεταφορά 15-20 ατόμων στο νέο φύλλο για τη διατήρηση των δυναμικών αποικιών.

### 6.3. Εκτροφή των κλώνων

Για την πραγματοποίηση κάθε βιοδοκιμής απαιτούνταν περίπου 70 ενήλικα θηλυκά άτομα *M. persicae*. Για την απόκτηση αυτών των ατόμων έγινε εκτροφή των αφίδων σε κουτιά (Blackman, 1971), όπως περιγράφηκε στην περίπτωση διατήρησης των κλώνων (Εικόνα 6.1-6.2). Στην περίπτωση της εκτροφής προτιμήθηκε ως φυτό ξενιστής ο καπνός *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) var. Σ79.



Σε φύλλο καπνού τοποθετημένο σε κουτί τοποθετήθηκαν από έξι έως οκτώ ενήλικα θηλυκά άτομα που είχαν παραληφθεί από τα κουτιά διατήρησης των κλώνων. Τα άτομα αφέθηκαν να γεννήσουν και τα ενήλικα απομακρύνθηκαν την

επόμενη μέρα και τοποθετήθηκαν σε άλλο φύλλο. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι το πολύ τρεις φορές έτσι ώστε να αποκτηθούν ανήλικα από τα ίδια ενήλικα άτομα και να διαφέρουν ηλικιακά το πολύ τρεις μέρες. Τα ανήλικα άτομα εκτράφηκαν μέχρι να ωριμάσουν και να χρησιμοποιηθούν σε κάθε βιοδοκιμή. Η αλλαγή του φύλλου σε αυτή την περίπτωση γινόταν ανά 3 ημέρες αλλά ξεκινούσε από την 3<sup>η</sup> ή 4<sup>η</sup> ημέρα (ανάλογα τον κλώνο) έτσι ώστε τα ανήλικα να έχουν αποκτήσει ένα μέγεθος τέτοιο ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες ατόμων από τραυματισμό κατά τη μεταφορά. Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν να μειωθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των ατόμων χρησιμοποιώντας τα ίδια άτομα ως ‘μητέρες’, να υπάρχει σε κάθε κουτί αποικία ατόμων ίδιας και γνωστής ηλικίας και να μην ξεπερνάει σε κάθε κουτί η αποικία τα 40 άτομα ώστε να εξασφαλιστούν καλές συνθήκες εκτροφής.



#### **6.4. Πειραματική διαδικασία ανίχνευσης ανθεκτικότητας στο pymetrozine και επίδρασής της στην αναπαραγωγική ικανότητα της αφίδας**

##### **6.4.α. Εύρος δόσεων και παρασκευή διαλυμάτων**

Οι κλώνοι εξετάστηκαν για την αντίδρασή τους στο pymetrozine σε έξι έως επτά διαφορετικές δόσεις πέρα της μηδενικής (μάρτυρας). Η συνιστώμενη από τον κατασκευαστή δόση για το pymetrozine είναι τα 75 mg/l. Το εύρος των δόσεων κυμάνθηκε από 0,5859 mg/l έως 75 mg/l σε δραστική ουσία. Συγκεκριμένα για τους κλώνους 06 Mel T60 και 06 Leh P68 οι δόσεις ήταν 0.59, 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5 mg/l, για τους κλώνους 06 Kat T78, 06 Nau P28, El Molle, 06 Mel P67, 06 Koz P9, 06 Kat T94, 06 Koz P26 και 05 Kar T13 οι δόσεις ήταν 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5 mg/l, και για τον κλώνο 05 Kar T51 οι δόσεις ήταν 1.17, 2.34, 4.69,



9.38, 18.75, 37.5, 75 mg/lit. Σε προκαταρκτική μελέτη οι κλώνοι δοκιμάστηκαν στο εύρος δόσεων από 1.17 έως 37.5 mg/lit και ανάλογα την αντίδρασή τους προστέθηκαν προς τα πάνω ή προς τα κάτω επιπλέον δόσεις.

Σε ζυγό ακριβείας ζυγίστηκε η διπλάσια ποσότητα της μέγιστης δόσης (πχ. 150 mg) και αφού διαλύθηκε σε 1 lt νερού με διαδοχικές αραιώσεις στο διπλάσιο παρελήφθησαν τα διαλύματα των διαφόρων συγκεντρώσεων από το διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης στο διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης.

#### 6.4.β. Διαδικασία Βιοδοκιμής

Πραγματοποιήθηκε η διαδικασία βιοδοκιμής εμφάνισης φύλλου σε διάλυμα pymetrozine. Επιλέχθηκαν κορυφαία φύλλα καπνού μικρού μεγέθους (Εικόνες 6.4-6.6). Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή φύλλων περίπου της ίδιας ανάπτυξης ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο δυνατό η παραλλακτικότητα που θα προερχόταν από τα φύλλα του καπνού. Αφού ξεπλύθηκαν, κάθε φύλλο εμφάνιστηκε για είκοσι δευτερόλεπτα στο διαλύματα της αντίστοιχης δόσης (Εικόνα 6.08) και αφέθηκε να στεγνώσει (Εικόνα 6.09-6.10). Στη συνέχεια κάθε φύλλο τοποθετήθηκε σε κουτί εκτροφής στο οποίο προηγουμένως είχε σημειωθεί η αντίστοιχη δόση (Εικόνα 6.11).

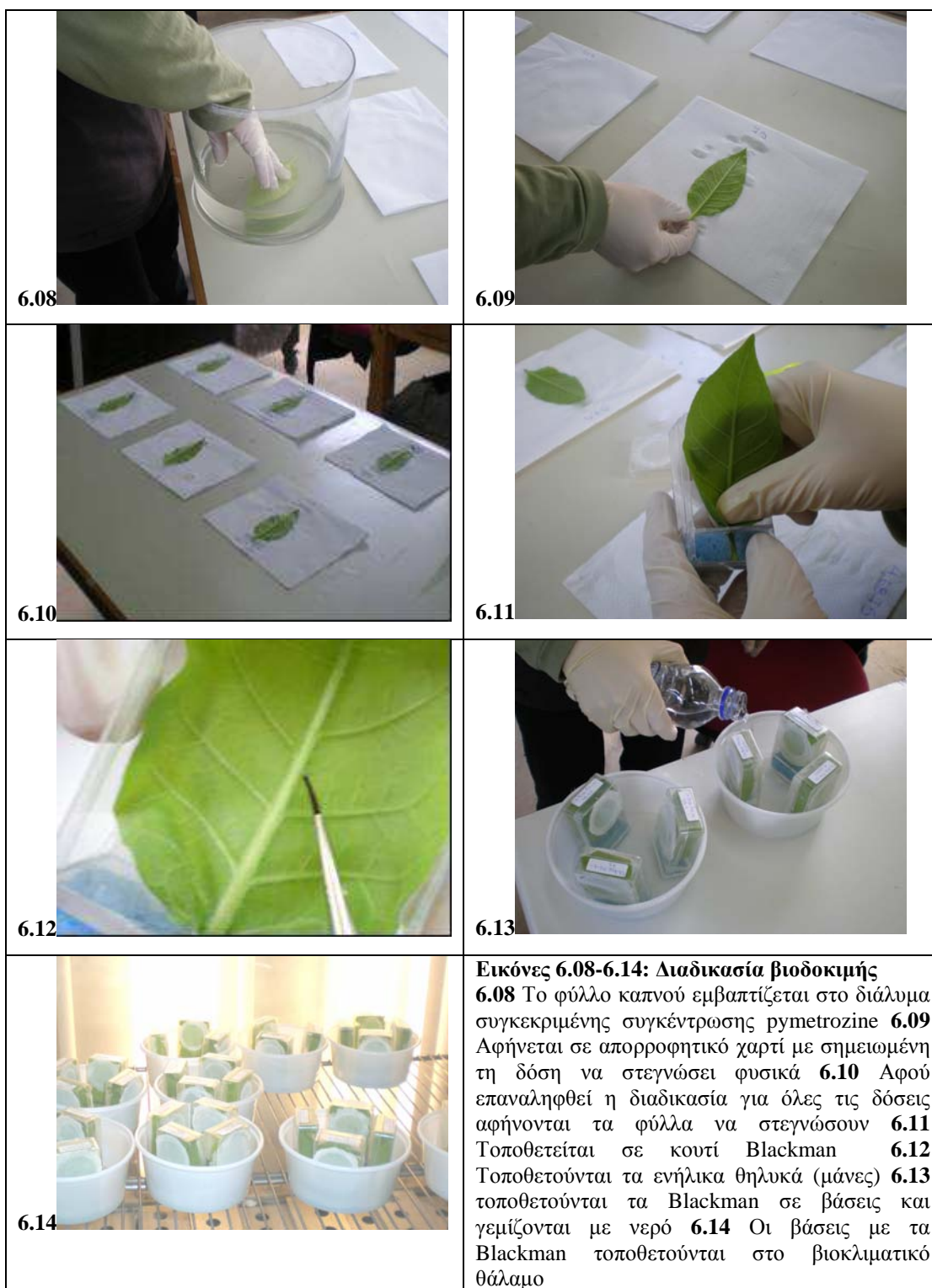


Εικόνα: 6.4. Φυτά καπνού στο θερμοκήπιο 6.5 & 6.6 Κουτί από αποσπώμενο κάλυμα anti-thrips για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των φυτών από αφίδες.



Συλλέχθηκαν τα ενήλικα θηλυκά των αφίδων του υπό εξέταση κλώνου από τα κουτιά εκτροφής και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C για περίπου δύο ώρες σε νηστεία. Μετά το πέρας των δύο ωρών οι αφίδες μεταφέρθηκαν από το ψυγείο και

τοποθετήθηκαν με λεπτό πινέλο στην κάτω επιφάνεια του φύλλου (Εικόνα 6.12), που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί στο κουτί εκτροφής. Σε κάθε φύλλο κάθε δόσης τοποθετήθηκαν από οκτώ έως δέκα ενήλικα θηλυκά έτσι ώστε να δώσουν τουλάχιστον είκοσι απογόνους συνολικά σε κάθε δόση.



Τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε δίσκους με νερό (Εικόνα 6.13) και στη συνέχεια σε βιοκλιματικό θάλαμο (Εικόνα 6.14) σε συνθήκες θερμοκρασίας  $20 \pm 1$  °C και φωτοπεριόδου 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκότους. Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκαν τα ενήλικα θηλυκά και καταμετρήθηκαν οι νεαρές προνύμφες που είχαν γεννηθεί. Η μέρα εκείνη θεωρήθηκε ως η μέρα μηδέν. Με το πέρας τεσσάρων ημερών (96 ωρών) από την απομάκρυνση των ενήλικων θηλυκών καταμετρήθηκαν τα άτομα που είχαν επιβιώσει σε κάθε δόση. Τα άτομα αυτά μεταφέρθηκαν σε νέο φύλλο, που δεν είχε εντομοκτόνο, σε νέο κουτί στο οποίο είχε σημειωθεί η δόση του διαλύματος στο οποίο είχε εμβαπτιστεί το φύλλο στο οποίο είχαν τοποθετηθεί η υπό εξέταση αφίδες και τοποθετήθηκαν εκ νέου στο βιοκλιματικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου. Με το πέρας επιπλέον τριών ημερών (72 ωρών) καταμετρήθηκαν εκ νέου τα άτομα που επιβίωσαν.

Για το χαρακτηρισμό ενός ατόμου ως νεκρό αρκούσε η παρατήρηση της μη κινητικότητας του ατόμου ακόμα και μετά από ενόχληση με λεπτό πινέλο, ενώ ως ζωντανό θεωρήθηκε κάθε άτομο που παρουσίαζε κινητικότητα ακόμα και ελάχιστη. Η παρατήρηση έγινε με γυμνό οφθαλμό και τη βοήθεια στερεοσκοπίου, όπου αυτό ήταν αναγκαίο. Κάθε βιοδοκιμή επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε κλώνο.

#### 6.4.γ. Μελέτη αναπαραγωγικής ικανότητας

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να διαπιστωθεί εάν η μεταχείριση με pymetrozine επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα των ατόμων που τη δέχθηκαν και επιβίωσαν αυτής.

Μετά το πέρας των δύο μετρήσεων για την καταγραφή των ατόμων που επιβίωσαν σε κάθε δόση λήφθηκε ένα άτομο από τα άτομα που επιβίωσαν της μεταχείρισης με τη δόση που ήταν πλησιέστερη της  $LD_{50}$  (στις 96 ώρες) και τοποθετήθηκε σε νέο αμεταχείριστο φύλλο και σε νέο κουτί στο οποίο είχε σημειωθεί η δόση από την οποία προήλθε το άτομο. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το μάρτυρα. Το κουτί τοποθετήθηκε στο βιοκλιματικό θάλαμο σε συνθήκες θερμοκρασίας  $20 \pm 1$  °C και φωτοπεριόδου 16 ωρών φωτός και 8 ωρών σκότους. Με την ενηλικίωση του ατόμου και για διάστημα τόσων ημερών όσων απαιτήθηκαν για να ενηλικιωθεί το συγκεκριμένο άτομο σημειώθηκε σε καθημερινή βάση ο αριθμός των απογόνων που γεννούσε ενώ οι απόγονοι απομακρυνόντουσαν μετά από κάθε μέτρηση. Καταγράφηκε έτσι, για κάθε επανάληψη, ο χρόνος (σε ημέρες) από τη γέννηση του ατόμου μέχρι την πρώτη αναπαραγωγή και ο συνολικός αριθμός των

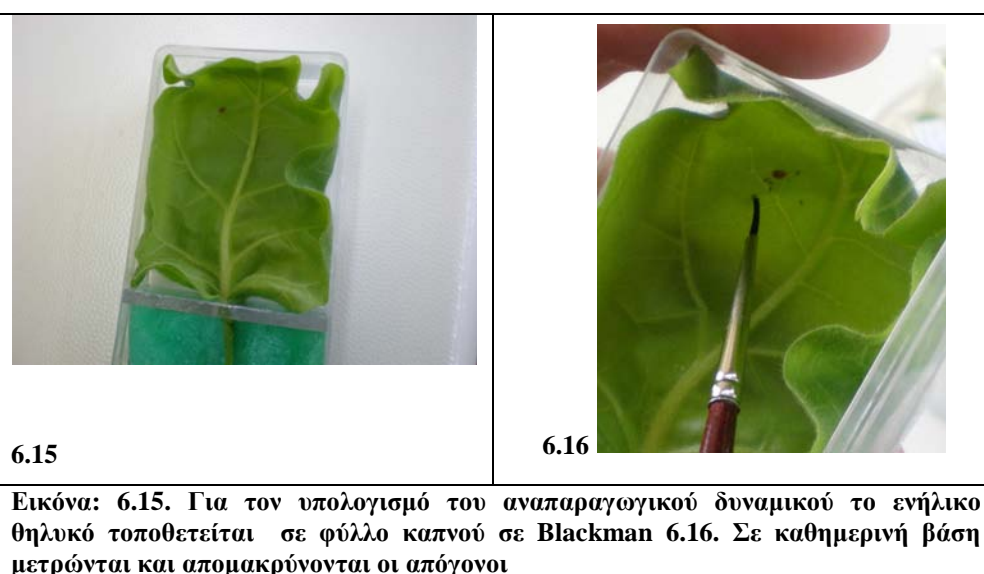
απογόνων που παρήγαγε στο διάστημα που προαναφέρθηκε έτσι ώστε να υπολογισθεί ο ενδογενής ρυθμός αύξησης  $r_m$ , μέγεθος που περιγράφει τη δυναμική αύξησης του πληθυσμού σε δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες και που προκύπτει από την εξίσωση των Wyatt & White (1977) για τις αφίδες :

$$r_m = 0,738 * (\ln Nd) / d$$

όπου:

d: ο χρόνος που απαιτήθηκε από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση του ατόμου (πρώτη αναπαραγωγή), και

Nd: ο συνολικός αριθμός των απογόνων που γέννησε το άτομο στο χρονικό διάστημα d.



## 6.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος SPSS v.13.0. Για να υπολογισθεί η μέση θανατηφόρα δόση ( $LD_{50}$ ) σε κάθε κλώνο για κάθε μέτρηση (στις 96 και 168 ώρες) ελήφθησαν συνολικά τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών που έγιναν σε κάθε κλώνο και έγινε probit ανάλυση με λογαριθμική μετατροπή των δεδομένων. Για να διερευνηθεί εάν υπάρχουν διαφορές (σε επίπεδο σημαντικότητας 5%) στις τιμές των  $LD_{50}$  ανάμεσα στους κλώνους που μελετήθηκαν είτε για τη μέτρηση στις 96 ώρες είτε για τη μέτρηση στις 168 ώρες χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA). Για τη διερεύνηση τυχόν στατιστικά σημαντικών διαφορών στις τιμές των  $LD_{50}$  των κλώνων ανάμεσα στις δύο μετρήσεις, στις 96 και στις 168 ώρες, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) με δύο παράγοντες

(χρόνος, κλώνοι) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη διερεύνηση διαφορών (σε επίπεδο σημαντικότητας 5%) ανάμεσα στις τιμές του ενδογενή ρυθμού αύξησης ( $r_m$ ) των διάφορων κλώνων είτε δέχθηκαν μεταχείριση με το pymetrozine είτε όχι, ενώ για τη διερεύνηση διαφορών στις τιμές των  $r_m$  ανάμεσα στα άτομα που δέχθηκαν τη μεταχείριση με pymetrozine και αυτών που δεν τη δέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση παραλλακτικότητας με δύο παράγοντες (κλώνοι, μεταχείριση-μη μεταχείριση) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Για να διερευνηθεί εάν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο χρόνο που απαιτήθηκε για να ενηλικιωθούν τα άτομα που δε δέχθηκαν μεταχείριση με pymetrozine και στον αντίστοιχο χρόνο για τα άτομα που επιβίωσαν της μεταχείρισης με τη μέση θανατηφόρα δόση ( $LD_{50}$ ) του εντομοκτόνου χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

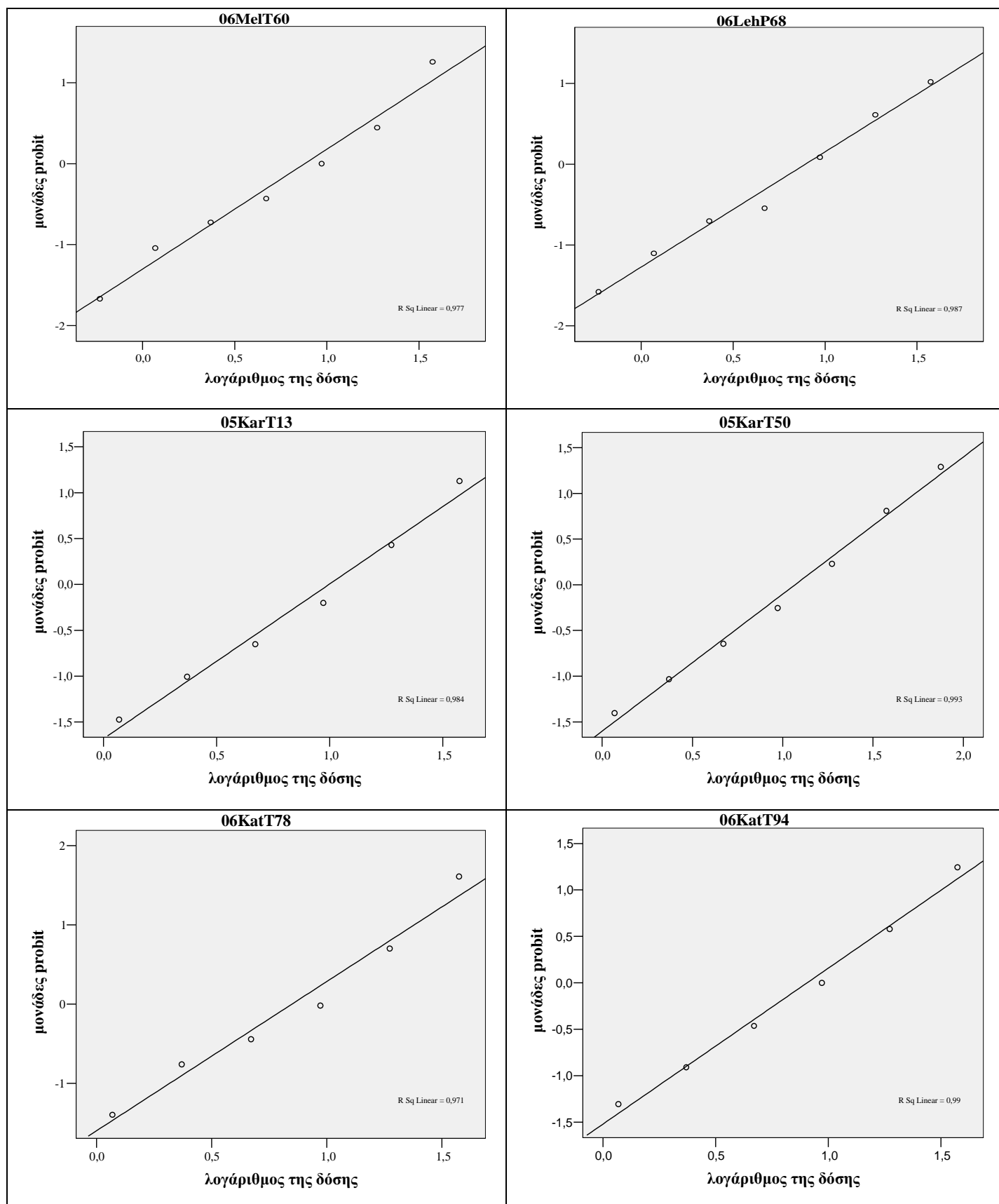
### 7.1. Επίδραση του pymetrozine στην επιβίωση

#### 7.1.α. Υπολογισμός θνησιμότητας στις 96 ώρες

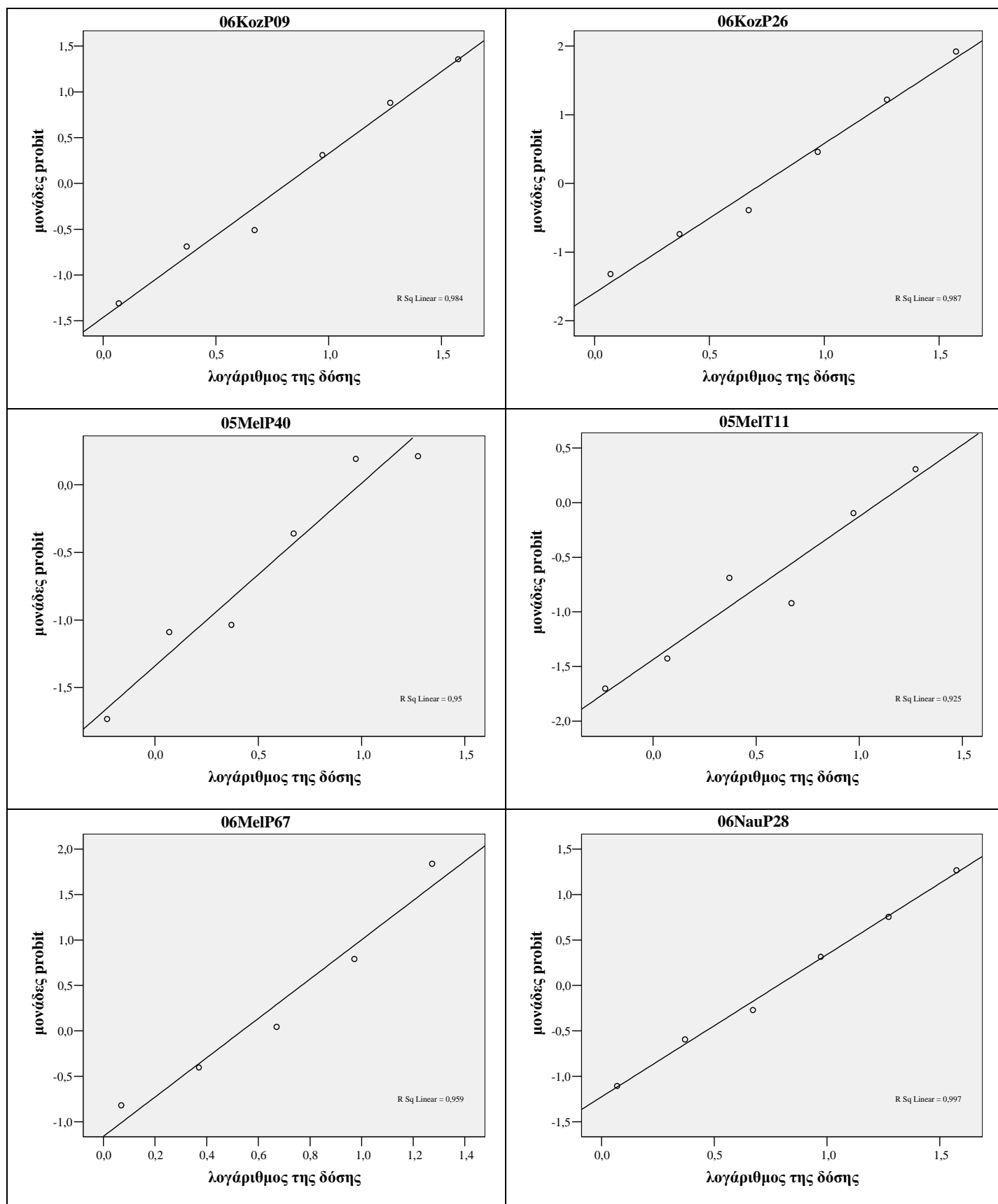
Η πρώτη μέτρηση στις 96 ώρες από την απομάκρυνση των ενηλίκων που γέννησαν τον πληθυσμό που εξετάστηκε (μέρα 0) έδωσε τιμές της μέσης θανατηφόρας δόσης για κάθε κλώνο, που με τη δοκιμασία ANOVA διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ( $F = 3,823$ ,  $\text{sig} = 0,003$ ). Η χαμηλότερη τιμή  $LD_{50}$  παρουσιάστηκε στον κλώνο 06MelP67 και ήταν τα 3,60 mg/lit δραστικής ουσίας ενώ η μεγαλύτερη στον κλώνο 05MelT11 και ήταν τα 12,19 mg/lit δραστικής ουσίας. Στον Πίνακα 7.1. φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 7.1:** Συνοπτικά τα συνολικά αποτελέσματα της probit ανάλυσης των μετρήσεων στις 96 ώρες (n:αριθμός ατόμων,  $LD_{50}$ :μέση θανατηφόρα δόση, CL(95%):95% διάστημα εμπιστοσύνης,  $LD_{95}$ : δόση που θανατώνει το 95% του πληθυσμού,  $\chi^2$ :βαθμός ετερογένειας, R.R.: συντελεστής ανθεκτικότητας)

κλώνος	n	$LD_{50}$ (mg/lit)	CL (95%)	$LD_{95}$ (mg/lit)	CL(95%)	κλίση	$\chi^2$	p	RR
06MelP67	518	3,60	3,04 - 4,21	20,89	16,06 - 29,74	2,15	6,54	0,162	1,00
06KozP26	571	5,60	4,84 - 6,48	32,90	25,26 – 46,26	2,14	3,99	0,407	1,55
06NauP28	536	6,15	5,05- 7,46	68,41	45,97 – 119,27	1,57	0,62	0,961	1,71
06KozP09	515	6,75	5,65 - 8,03	53,99	38,73 – 84,72	1,82	3,42	0,49	1,87
06KatT78	524	7,52	6,34 - 9,00	62,56	43,57 – 102,29	1,79	4,45	0,349	2,09
El Molle	490	7,87	6,54 - 9,49	70,04	48,34 – 116,63	1,73	2,57	0,632	2,18
06MelT60	538	7,89	6,40 - 9,89	108,08	67,83 – 204,79	1,44	3,90	0,564	2,19
06LehP68	570	8,04	6,60 - 9,93	110,36	70,96 – 200,53	1,45	3,11	0,683	2,23
06KatT94	541	8,23	6,89 - 9,97	79,30	53,57 – 134,87	1,67	1,46	0,835	2,28
05MelP40	276	9,42	6,53 - 16,44	157,78	63,23 – 822,52	1,34	2,73	0,604	2,61
05KarT13	701	10,26	8,74 - 12,20	100,31	69,76 – 161,58	1,66	3,03	0,553	2,85
05KarT51	766	12,08	10,20 - 14,46	152,74	104,38 – 250,06	1,49	1,71	0,888	3,35
05MelT11	344	12,19	8,89 - 19,12	217,26	94,33 – 907,74	1,31	5,93	0,204	3,38



**Σχήμα 7.1** Καμπύλες θνησιμότητας των μετρήσεων στις 96 ώρες. Απεικονίζεται η θνησιμότητα εκφρασμένη σε μονάδες probits σε κάθε δόση μετά τη λογαριθμική μετατροπή της. Η δόση LD<sub>50</sub> αντιστοιχεί στην τιμή probit 0. Ο κλώνος σημειώνεται σε κάθε γράφημα.



**Σχήμα 7.1** Καμπύλες θνησιμότητας των μετρήσεων στις 96 ώρες. Απεικονίζεται η θνησιμότητα εκφρασμένη σε μονάδες probits σε κάθε δόση μετά τη λογαριθμική μετατροπή της. Η δόση LD<sub>50</sub> αντιστοιχεί στην τιμή probit 0. Ο κλώνος σημειώνεται σε κάθε γράφημα.

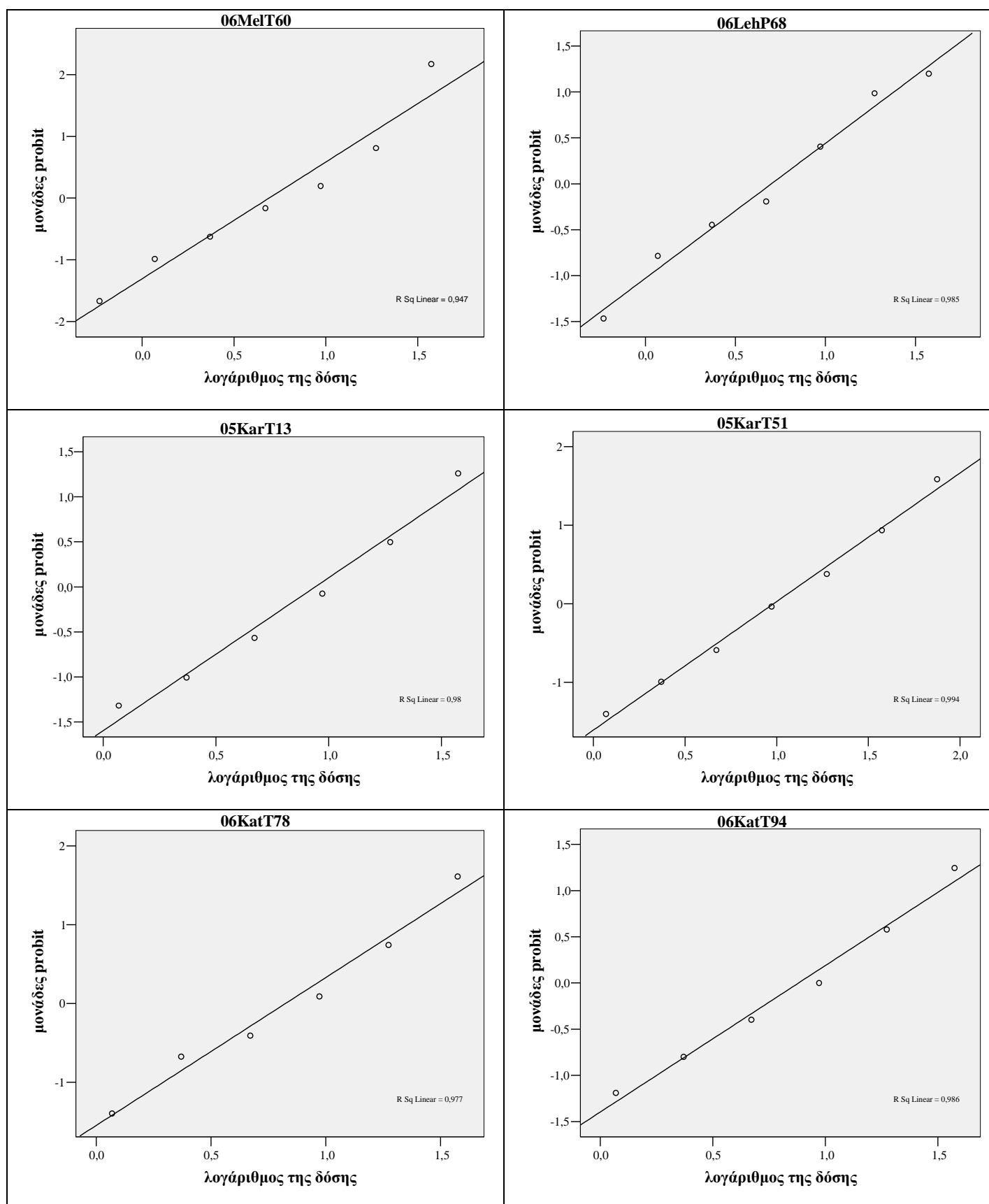


### 7.1.β. Υπολογισμός θνησιμότητας στις 168 ώρες

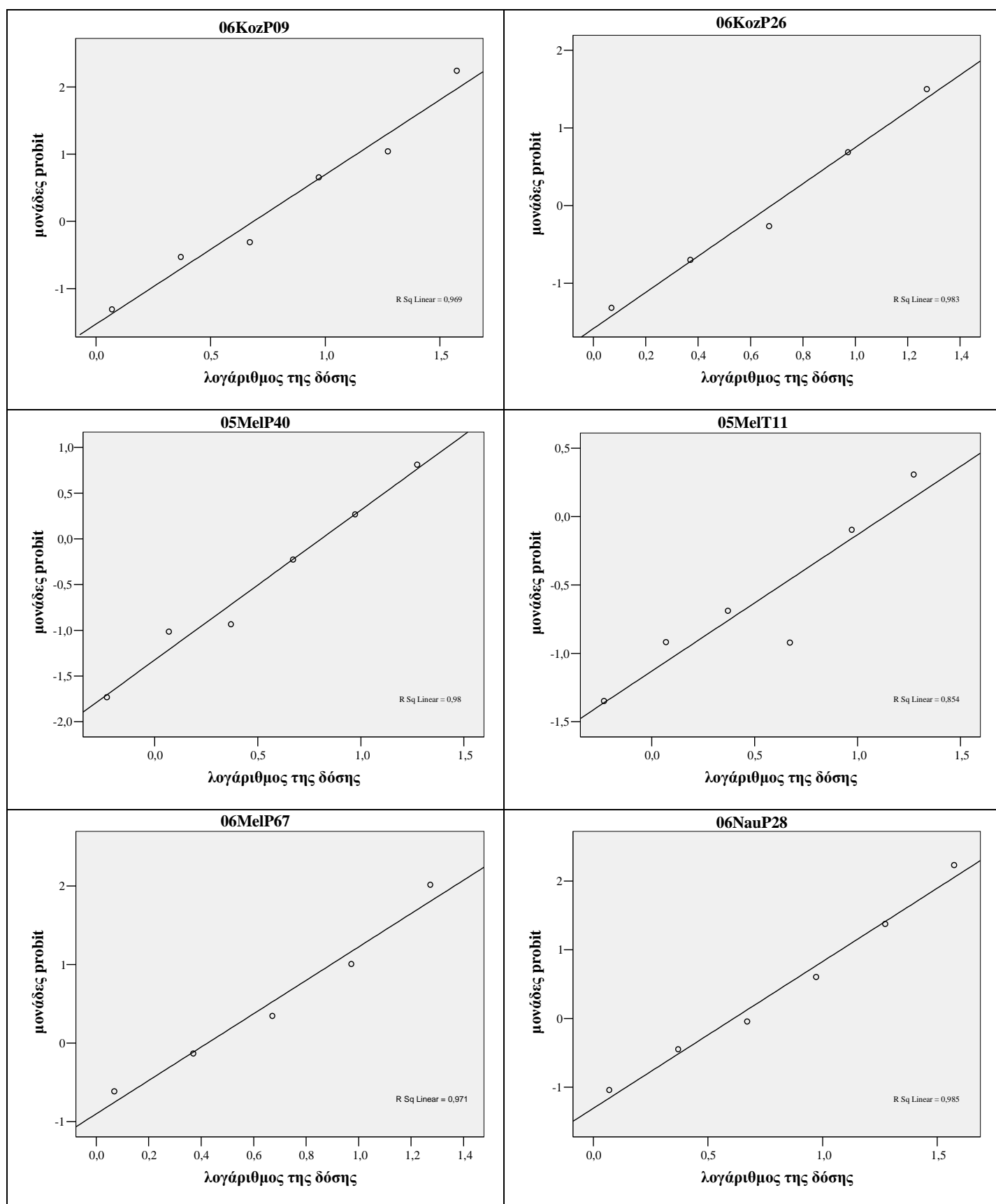
Ανάλογα και στη δεύτερη μέτρηση στις 168 ώρες από την απομάκρυνση των ενηλίκων που γέννησαν τον πληθυσμό που εξετάστηκε (μέρα 0) παρουσιάστηκε σημαντική διαφορά στις τιμές του LD<sub>50</sub> σε κάθε κλώνο ( F = 6,756, sig =0,000<0,05). Η χαμηλότερη τιμή παρουσιάστηκε πάλι στον κλώνο 06MelP67 και ήταν τα 2,72 mg/lt και η υψηλότερη στον 05MelT11 με τιμή 12,91 mg/lt. Στον Πίνακα 7.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δεύτερης μέτρησης.

**Πίνακας 7.2:** Συνοπτικά τα συνολικά αποτελέσματα της probit ανάλυσης των μετρήσεων στις 168 ώρες (n:αριθμός ατόμων, LD<sub>50</sub>:μέση θανατηφόρα δόση, CL(95%):95% διάστημα εμπιστοσύνης, LD<sub>95</sub>: δόση που θανατώνει το 95% του πληθυσμού, χ<sup>2</sup>:βαθμός ετερογένειας, R.R.: συντελεστής ανθεκτικότητας)

κλώνος	n	LD50 (mg/lt)	CL (95%)	LD95	CL(95%)	κλίση	χ <sup>2</sup>	p	RR
06MelP67	518	2,72	2,23 - 3,22	17,07	13,03 - 24,69	2,06	3,56	0,469	1,00
06NauP28	536	4,30	3,61 - 5,04	27,83	21,02 – 40,53	2,03	2,49	0,647	1,58
06KozP26	571	4,84	4,23 - 5,54	23,25	18,37 – 31,44	2,41	5,33	0,255	1,78
06LehP68	570	5,05	4,15 - 6,15	67,97	45,66 – 115,58	1,46	3,14	0,678	1,86
06KozP09	515	5,16	4,38 - 6,04	31,10	23,68 – 44,67	2,11	6,07	0,194	1,90
06MelT60	538	5,48	4,57 - 6,60	50,01	35,11 – 79,82	1,71	6,64	0,249	2,02
05MelP40	276	6,46	4,86 - 9,39	68,77	35,49 – 204,29	1,60	1,82	0,768	2,38
06KatT78	524	7,02	5,92 - 8,39	58,62	41,03 – 95,17	1,79	3,83	0,43	2,59
El Molle	490	7,32	6,15 - 8,72	54,71	39,34 – 85,44	1,88	3,17	0,53	2,70
06KatT94	541	7,76	6,44 - 9,48	86,74	56,88 – 154,77	1,57	1,98	0,739	2,86
05KarT13	701	9,09	7,76 - 10,75	89,00	62,57 – 141,04	1,66	3,58	0,465	3,34
05KarT51	766	9,92	8,48 - 11,68	104,10	74,59 – 159,32	1,61	1,28	0,937	3,65
05MelT11	344	12,91	6,65 - 69,41	457,48	81,2-298330,5	1,05	6,93	0,14	4,75



**Σχήμα 7.1 Καμπύλες θνησιμότητας των μετρήσεων στις 168 ώρες.** Απεικονίζεται η θνησιμότητα εκφρασμένη σε μονάδες probits σε κάθε δόση μετά τη λογαριθμική μετατροπή της. Η δόση LD<sub>50</sub> αντιστοιχεί στην τιμή probit 0. Ο κλώνος σημειώνεται σε κάθε γράφημα.

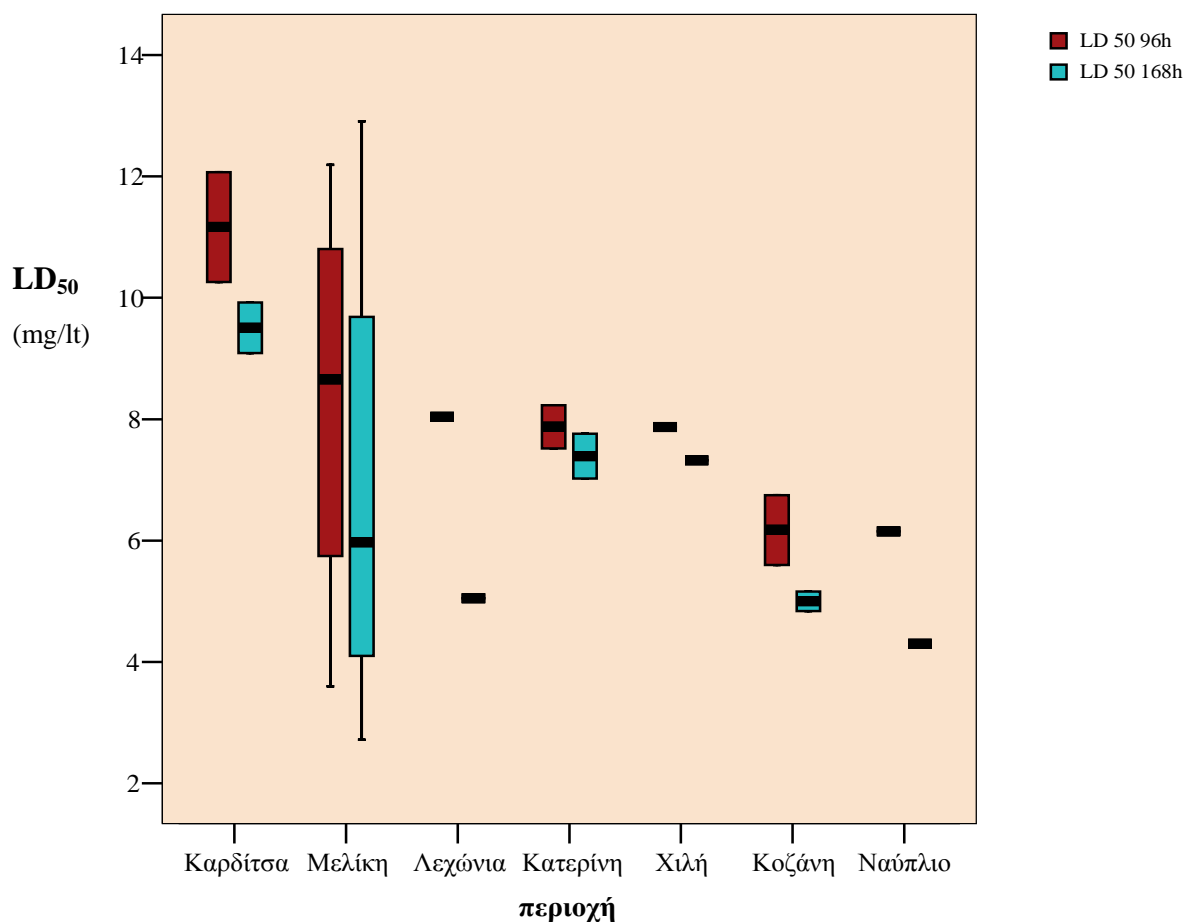


**Σχήμα 7.1** Καμπύλες θνησιμότητας των μετρήσεων στις 168 ώρες. Απεικονίζεται η θνησιμότητα εκφρασμένη σε μονάδες probits σε κάθε δόση μετά τη λογαριθμική μετατροπή της. Η δόση LD<sub>50</sub> αντιστοιχεί στην τιμή probit 0. Ο κλώνος σημειώνεται σε κάθε γράφημα.

Η δοκιμασία ANOVA με δύο παράγοντες (κλώνοι, χρόνος μέτρησης της θνησιμότητας) έδειξε ό,τι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της LD<sub>50</sub> ανάμεσα στους κλώνους για τις μετρήσεις των 96 και 168 ωρών (F=8,928, sig= 0,000<0,05). Επίσης υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών τις LD<sub>50</sub> της μέτρησης στις 96 ώρες και των τιμών της LD<sub>50</sub> της μέτρησης στις 168 ώρες (F= 9,603, sig=0,003<0,05), ενώ δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου και του κλώνου (F=0,659, sig=0,767>0,05).

### 7.1.γ. Περιοχή δειγματοληψίας και LD<sub>50</sub>

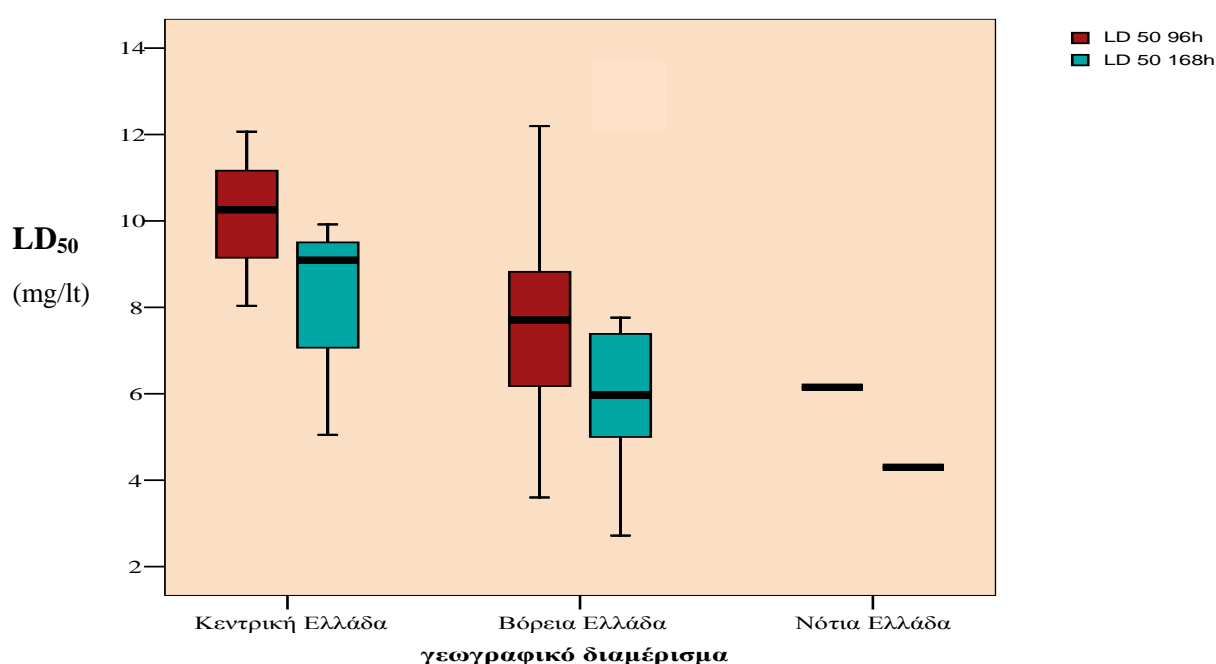
Οι κλώνοι που μελετήθηκαν προήλθαν από δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε σε επτά διαφορετικές περιοχές. Ταξινομώντας τις τιμές των LD<sub>50</sub> ανάλογα με την περιοχή από την οποία προήλθε ο κλώνος παρατηρούμε ότι οι κλώνοι που προέρχονται από την περιοχή της Καρδίτσας είναι οι πιο ανθεκτικοί καθώς στις 96 ώρες επέδειξαν τη μεγαλύτερη τιμή του μέσου όρου των επιμέρους LD<sub>50</sub> (11,17mg/l) ενώ οι λιγότερο ανθεκτικοί κλώνοι συναντώνται στις περιοχές του Ναυπλίου (6,15mg/l) και της Κοζάνης (6,17 mg/l). Από τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στις 168 ώρες παρατηρείται ανάλογη διαβάθμιση της ανθεκτικότητας με τους κλώνους από την περιοχή της Καρδίτσας να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη τιμή του μέσου όρου των επιμέρους LD<sub>50</sub> (9,50 mg/l) και τους κλώνους από το Ναύπλιο και την Κοζάνη να έχουν τιμή LD<sub>50</sub> 4,30 και 4,99 mg/l αντίστοιχα. Τα παραπάνω μπορούν να απεικονιστούν γραφικά στο γράφημα 7.1.



**Γράφημα 7.1:** Κατανομή της LD<sub>50</sub> της αφίδας *Myzus persicae* ανά περιοχή στις 96 (κόκκινο χρώμα) και 168 ώρες (μπλε χρώμα)

#### 7.1.δ. Γεωγραφικό διαμέρισμα Ελλάδας και LD<sub>50</sub>

Με μια ευρύτερη κατηγοριοποίηση των περιοχών δειγματοληψίας των κλώνων που να αφορά το γεωγραφικό διαμέρισμα από το οποίο προέρχονται οι κλώνοι παρατηρούμε ότι οι λίγοι κλώνοι που εξετάστηκαν και προέρχονται από την Κεντρική Ελλάδα φαίνονται ως πιο ανθεκτικοί από τους υπόλοιπους με την τιμή του μέσου όρου των επι μέρους LD<sub>50</sub> να ισούται με 10,12 mg/lι στις 96 ώρες και 8,02 στις 168 ώρες, ενώ περισσότερο ευαίσθητος φαίνεται ο κλώνος από τη Νότια Ελλάδα καθώς οι τιμές LD<sub>50</sub> είναι 6,15 και 4,30 mg/lι όπως προκύπτουν από τις μετρήσεις στις 96 και 168 ώρες αντίστοιχα (Γράφημα 7.2).

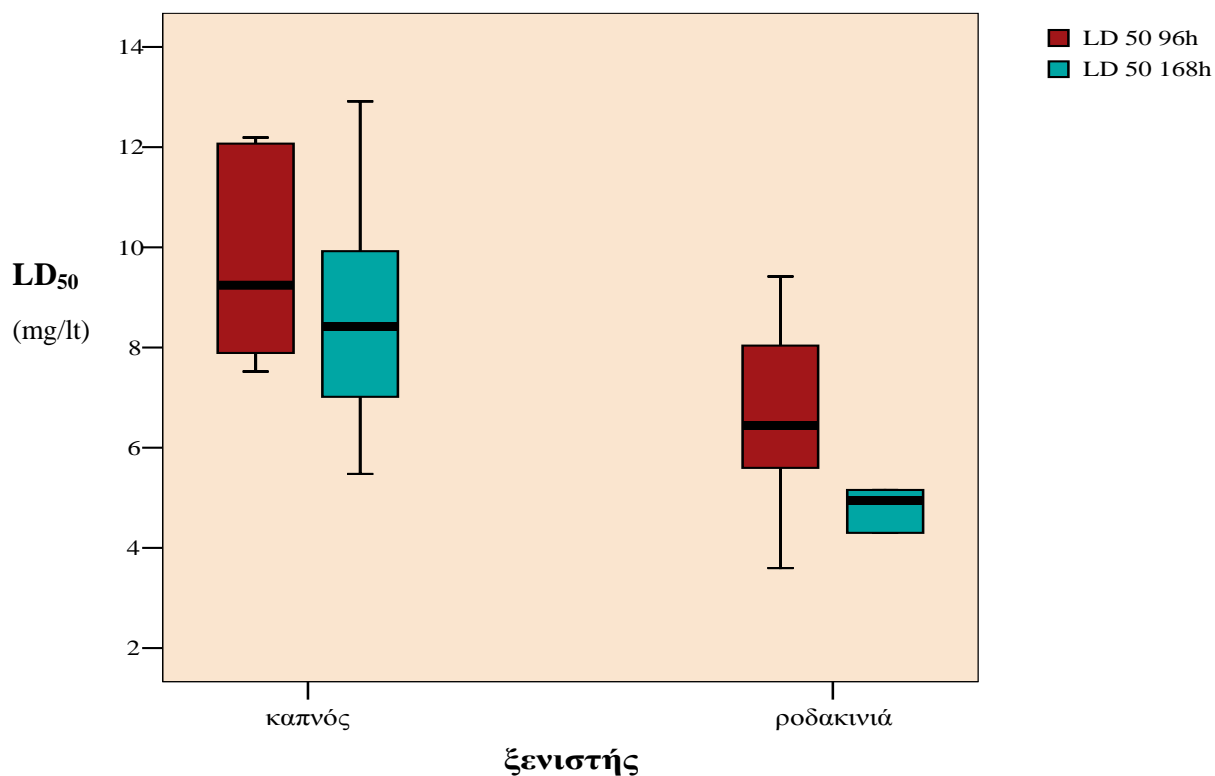


**Γράφημα 7.2:** Κατανομή της LD<sub>50</sub> της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή και γεωγραφικό διαμέρισμα μετά από έλεγχο στις 96 (κόκκινο χρώμα) και στις 168 ώρες (μπλε χρώμα) μετά την εφαρμογή του pymetrozine.

#### 7.1.ε. Ξενιστής και LD<sub>50</sub>

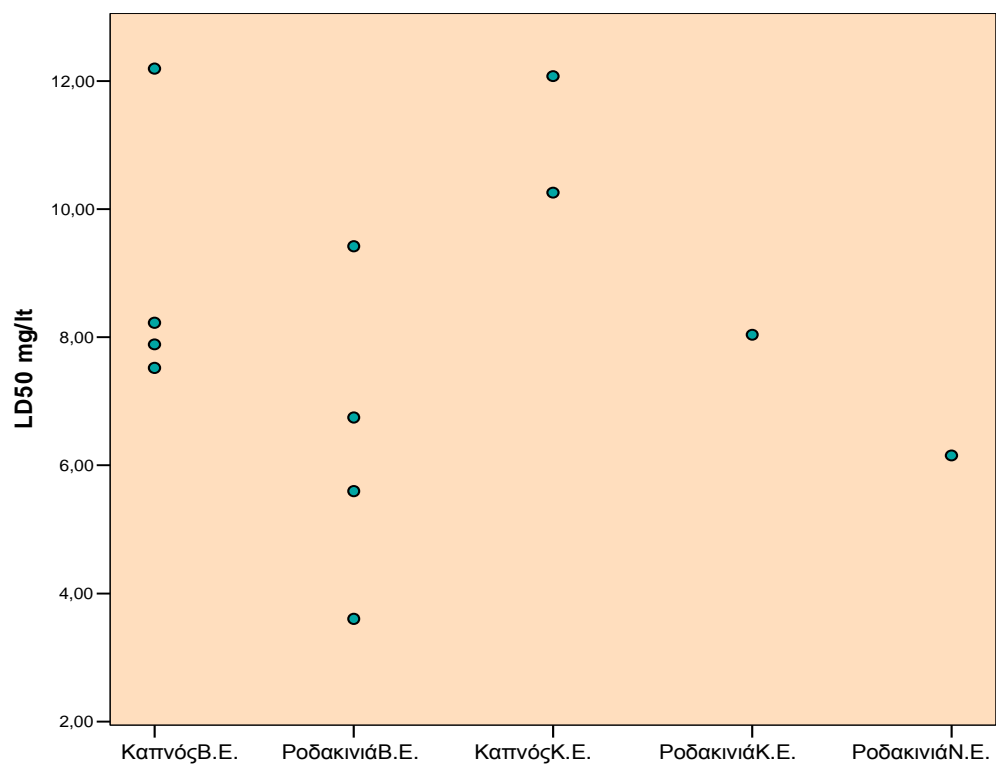
Οι κλώνοι που εξετάστηκαν για την αντίδρασή τους σε διάφορες δόσεις pymetrozine έτσι ώστε να εξακριβωθεί η εμφάνιση ή μη ανθεκτικότητας σε αυτή τη δραστική ουσία, προήλθαν από διαφορετικά φυτά ξενιστές (καπνός, ροδάκινο). Οι κλώνοι που συλλέχθηκαν από φυτά καπνού επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη μεταχείριση με pymetrozine καθώς παρουσίασαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερες τιμές LD<sub>50</sub> στις μετρήσεις των 96 και 168 ωρών με τις τιμές αυτές να αγγίζουν τα 9,69 και

8,70 mg/lt αντίστοιχα. Ο μέσος όρος των τιμών της  $LD_{50}$  από τις δυο μετρήσεις θνησιμότητας στις 96 και 168 ώρες στους πληθυσμούς από τους κλώνους που συλλέχθηκαν από δέντρα ροδακινιάς ήταν 6,59 και 4,75 mg/lt αντίστοιχα φανερώνοντας μια μεγαλύτερη ευαισθησία στη δραστική ουσία. Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στο Γράφημα 7.3.

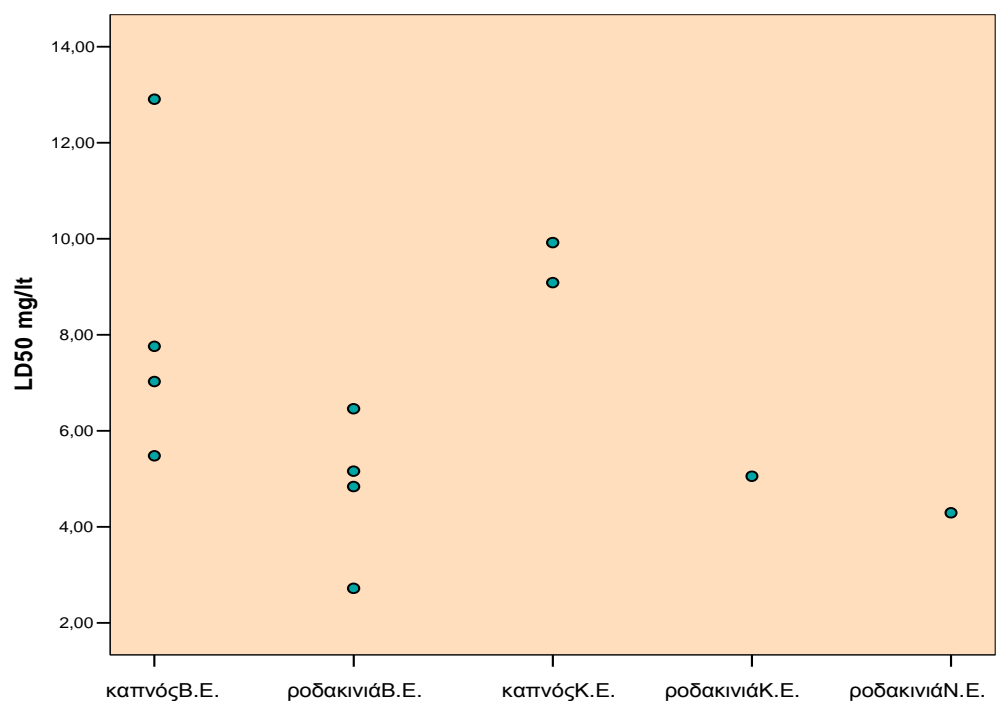


**Γράφημα 7.3:** Κατανομή της  $LD_{50}$  της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή στις 96 (κόκκινο χρώμα) και 168 ώρες (μπλε χρώμα)

Στα γραφήματα 7.4 και 7.5 απεικονίζεται η κατανομή των τιμών της  $LD_{50}$  των αφίδων ανά ξενιστή ανα γεωγραφικό διαμέρισμα για τις μετρήσεις στις 96 και 168 ώρες αντίστοιχα.



**Γράφημα 7.4:** Κατανομή LD<sub>50</sub> της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή ανά γεωγραφικό διαμέρισμα στις 96 ώρες

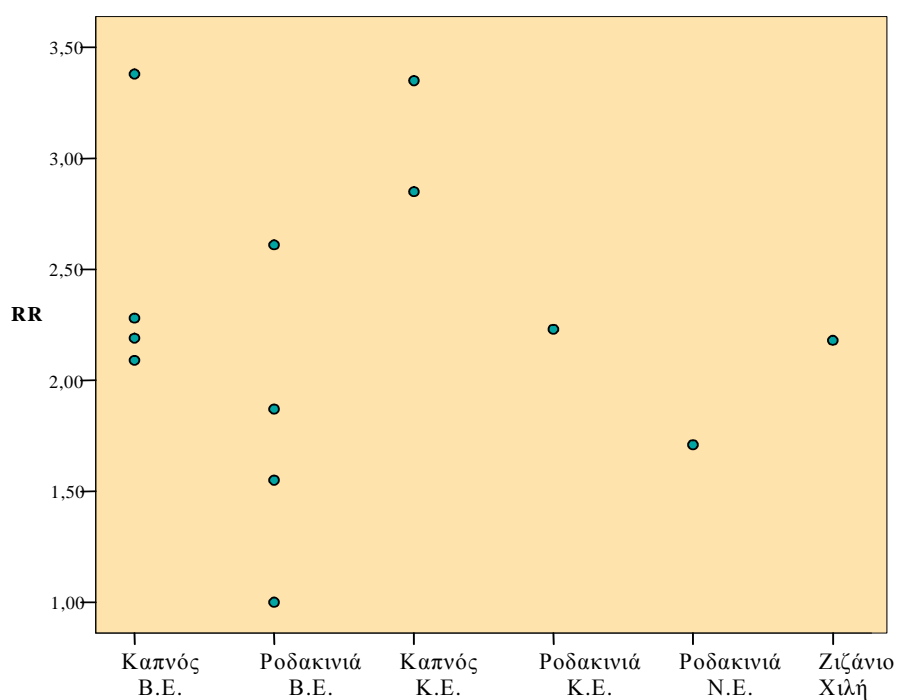


**Γράφημα 7.5:** Κατανομή LD<sub>50</sub> της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή ανά γεωγραφικό διαμέρισμα στις 168 ώρες

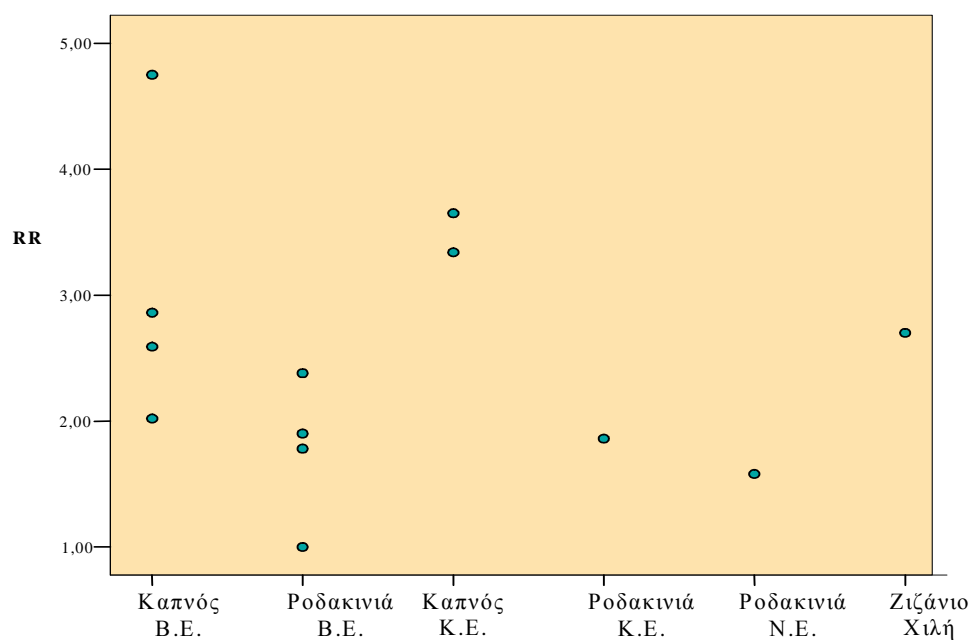


### 7.1.στ. Συντελεστής ανθεκτικότητας (RR)

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 7.1 οι τιμές του συντελεστή ανθεκτικότητας κυμάνθηκαν από το 1 έως το 3,38. Ο πιο ευαίσθητος κλώνος ήταν ο 06MeIP67 και αποτέλεσε τον κλώνο με βάση την τιμή του LD<sub>50</sub> που αντιστοιχεί σε αυτό ορίστηκαν οι συντελεστές ανθεκτικότητας των υπολοίπων κλώνων. Έτσι συντελεστή ανθεκτικότητας ίσο με 1 εμφάνισε ο MeIP67 ενώ τον υψηλότερο συντελεστή ανθεκτικότητας εμφάνισε ο κλώνος 05MeIT11. Στην Κεντρική Ελλάδα το χαμηλότερο συντελεστή είχε ο κλώνος από τα Λεχώνια (06LehP68) με τιμή 2,23 και το μεγαλύτερο ο κλώνος από την Καρδίτσα (05KarT51) με τιμή 3,53. Στη Βόρεια Ελλάδα τη χαμηλότερη τιμή παρουσίασε ο κλώνος 06MeIP67 (1,00) και την υψηλότερη ο κλώνος 05MeIT11 (3,38) και οι δύο από τη Μελίκη. Σε μια κατάταξη ανάλογα με τον ξενιστή από τον οποίο συλλέχθηκαν οι κλώνοι φαίνεται ότι οι κλώνοι που συλλέχθηκαν από φυτά καπνού είχαν μεγαλύτερο συντελεστή κατά μέσο όρο από αυτούς που συλλέχθηκαν από δέντρα ροδακινιάς (2,69 vs 1,83). Πιο συγκεκριμένα, στον καπνό τη μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή είχε ο κλώνος 05MeIT11 (3,38) και τη χαμηλότερη ο κλώνος 06KatT78 (2,09) ενώ στο ροδάκινο την υψηλότερη τιμή του συντελεστή ανθεκτικότητας είχε ο κλώνος 05MeIP40 (2,61) και τη χαμηλότερη ο κλώνος 06MeIP67 (1,00). Τα παραπάνω απεικονίζονται στα ακόλουθα γραφήματα:



**Γράφημα 7.6:** Κατάταξη του RR της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή ανά περιοχή στις 96 ώρες



**Γράφημα 7.7: Κατάταξη του RR της αφίδας *Myzus persicae* ανά ξενιστή ανά περιοχή στις 168 ώρες**

## 7.2. Επίδραση pymetrozine στον ενδογενή ρυθμό αύξησης του πληθυσμού και στην αναπαραγωγική ικανότητα των αφίδων

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των απογόνων των ατόμων που επιβίωσαν της μέσης θανατηφόρας δόσης σε κάθε κλώνο για την εύρεση του δείκτη  $r_m$  και την εξακρίβωση της επίδρασης ή όχι του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα των ατόμων αυτών. Τα  $r_m$  των διάφορων κλώνων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των μαρτύρων κάθε κλώνου.

Στον Πίνακα 7.6 φαίνονται ο αριθμός των απογόνων των ατόμων που εξετάστηκαν σε κάθε κλώνο, οι μέρες που απαιτήθηκαν για την ενηλικίωση των υπό εξέταση ατόμων καθώς και ο δείκτης  $r_m$ .

**Πίνακας 7.6:** Οι τιμές  $N(d)$ ,  $d$  και  $R_m$  του μάρτυρα και των ατόμων που επιβίωσαν της δόσης  $LD_{50}$ . ( $N(d)$ : ο συνολικός αριθμός των απογόνων που γέννησε το άτομο σε διάστημα  $d$ ,  $d$ : το διάστημα τόσων ημερών όσων απαιτήθηκαν από τη στιγμή της γέννησης έως την ενηλικίωση,  $r_m$ : ο ενδογενής ρυθμός αύξησης,  $s.dv$ : τυπική απόκλιση,  $s.e$ : τυπικό σφάλμα)

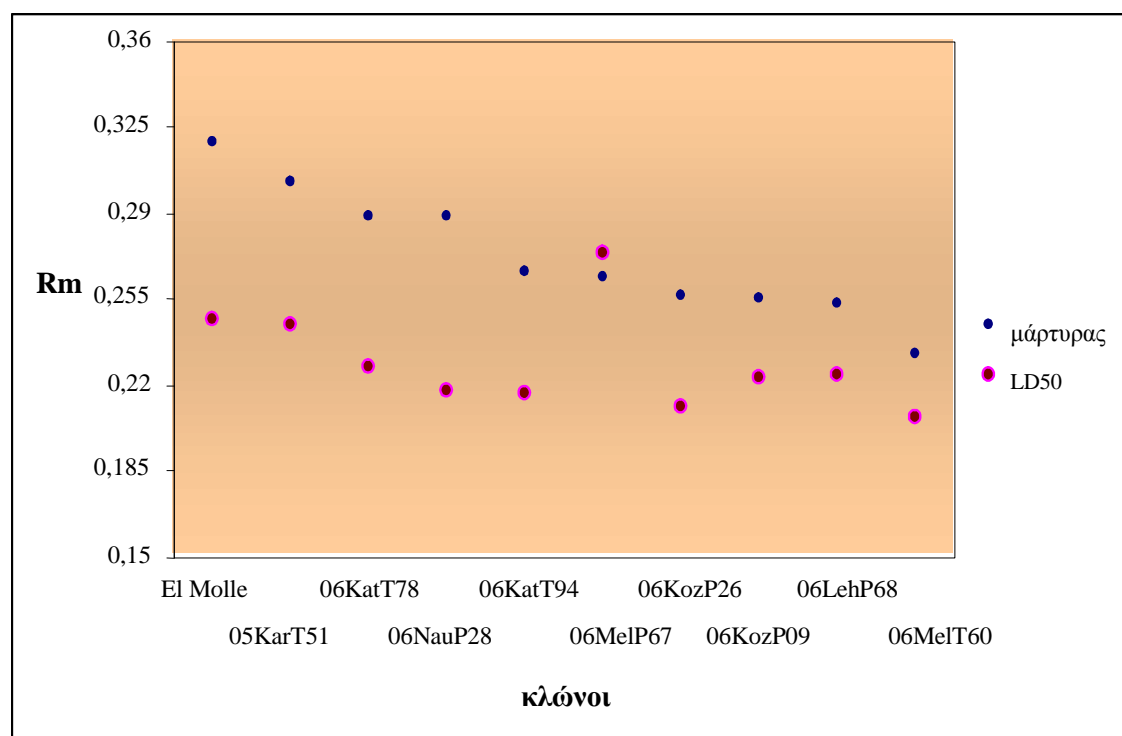
κλώνος	Nd ld(0)	d	μ.ο. $r_m(0)$	s.dv.	s.e.	Nd LD <sub>50</sub>	d	μ.ο. $r_mLD_{50}$	s.dv	s.e
El Molle	49,3	9	<b>0,3194</b>	0,00457	0,2998	62,7	12,3	<b>0,2472</b>	0,00429	0,2287
05KarT51	50,7	8,3	<b>0,3030</b>	0,02855	0,1802	40,7	11	<b>0,2446</b>	0,01225	0,1920
06KatT78	50,7	10	<b>0,2892</b>	0,00589	0,2639	42,3	11,7	<b>0,2273</b>	0,03439	0,0793
06NauP28	44	9,7	<b>0,2885</b>	0,01515	0,2233	34,3	12	<b>0,2177</b>	0,02463	0,1118
06KatT94	51,7	11	<b>0,2663</b>	0,01664	0,1947	46,7	13	<b>0,2173</b>	0,00920	0,1777
06MelP67	35,3	10	<b>0,2644</b>	0,01637	0,1940	46,3	10,3	<b>0,2742</b>	0,00604	0,2482
06KozP26	29	9,7	<b>0,2566</b>	0,01290	0,2011	31,3	12	<b>0,2115</b>	0,00461	0,1917
06KozP09	26	9,3	<b>0,2556</b>	0,02277	0,1576	38	12	<b>0,2234</b>	0,00987	0,1809
06LehP68	60	12	<b>0,2538</b>	0,01599	0,1850	64,7	13,7	<b>0,2246</b>	0,00444	0,2055
06MelT60	38,3	12,3	<b>0,2328</b>	0,04574	0,0360	46	13,7	<b>0,2068</b>	0,02102	0,1164

Η δοκιμασία ANOVA έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των απογόνων ανάμεσα στους κλώνους που δεν είχαν δεχθεί μεταχείριση με pymetrozine (μάρτυρες) ( $F= 4,446$ ,  $sig= 0,003$ ). Αντίθετα ο αριθμός των απογόνων

δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα στους κλώνους που δέχθηκαν την επίδραση της μέσης θανατηφόρας δόσης του pymetrozine ( $F= 1,691$ ,  $\text{sig}= 0,157$ ).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά στον αριθμό των ημερών που απαιτήθηκαν για την ενηλικίωση των ατόμων και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή ανάμεσα στα άτομα του μάρτυρα κάθε κλώνου ( $F= 2,072$ ,  $\text{sig}= 0,084$ ) και ανάμεσα στα άτομα του πληθυσμού που επιβίωσε της μεταχείρισης με την  $LD_{50}$  ( $F= 1,742$ ,  $\text{sig}=0,144$ ).

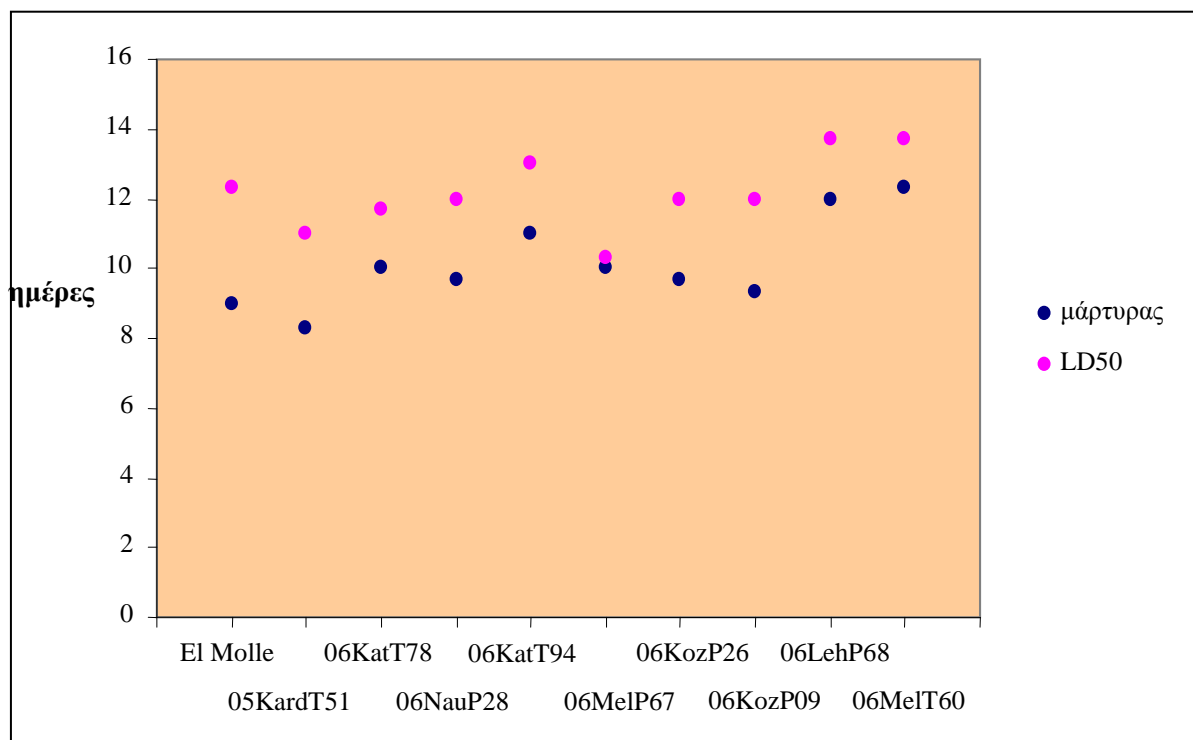
Οι τιμές του ενδογενή ρυθμού αύξησης κάθε κλώνου διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους στην περίπτωση των μαρτύρων ( $F= 2,696$ ,  $\text{sig}= 0,031$ ) με το μεγαλύτερο δείκτη να εμφανίζεται στην περίπτωση του κλώνου El Molle (0,30) και το μικρότερο στην περίπτωση του κλώνου 06MelT60 (0,2328), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην περίπτωση των ατόμων που επιβίωσαν της μεταχείρισης με τη μέση θανατηφόρα δόση ( $F=1,560$ ,  $\text{sig}= 0,195$ ), όπου ο μεγαλύτερος δείκτης αναπαραγωγικής ικανότητας σημειώθηκε στον κλώνο 06MelP67 (0,2742) και ο μικρότερος στον 06MelT60 πάλι (0,2068).



**Σχήμα 7.8:** Κατανομή του  $r_m$  του μάρτυρα και των ατόμων που εκτέθηκαν στην  $LD_{50}$  της αφίδας *Myzus persicae* κάθε κλώνου.

Η δοκιμασία ANOVA έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του δείκτη αναπαραγωγικής ικανότητας των κλώνων που δέχθηκαν μεταχείριση σε σύγκριση με αυτούς που δε δέχθηκαν ( $F=32,573$ ,

sig=0,000<0,05), γεγονός που αποδεικνύει ότι η μεταχείριση με pymetrozine μπορεί να επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα των ατόμων που τη δέχονται. Πιο συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί που εκτέθηκαν στο pymetrozine είχαν μικρότερο δείκτη αναπαραγωγικής ικανότητας σε σύγκριση με τους πληθυσμούς που δε δέχθηκαν μεταχείριση, με τη διαφορά κατά μέσο όρο να αγγίζει το 0,043. Μόνο στον κλώνο 06MelP67 ο  $r_m$  είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση των ατόμων που δέχθηκαν μεταχείριση σε σύγκριση με τα άτομα που δε δέχθηκαν μεταχείριση (μάρτυρας) (Γράφημα 7.8). Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά και στο χρόνο που απαιτήθηκε για την ενηλικίωση των ατόμων που δέχθηκαν μεταχείριση σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες ( $t=-6,836$ , sig= 0,000) με τα άτομα που επιβίωσαν της μεταχείρισης να απαιτούν περισσότερο χρόνο (2,033 ημέρες κατά μέσο όρο) για να ενηλικιωθούν. Παρακάτω απεικονίζονται οι ημέρες που απαιτήθηκαν για την ενηλικίωση σε κάθε κλώνο (Γράφημα 7.9)



**Σχήμα 7.9:** Κατανομή του αριθμού των ημερών που απαιτήθηκαν για την ενηλικίωση του μάρτυρα και των ατόμων που εκτέθηκαν στο εντομοκτόνο με την LD50 της Αφείδας *Myzus persicae* κάθε κλώνων.

## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην Ελλάδα το pymetrozine έχει ενταχθεί σε προγράμματα αντιμετώπισης αφίδων από το 1999, οπότε και πήρε την πρώτη προσωρινή άδεια. Το 2000 χρησιμοποιήθηκε περισσότερο στις περιοχές της Θράκης (νομοί Ροδόπης, Ξάνθης) για την αντιμετώπιση της αφίδας σε καλλιέργειες καπνού κυρίως, της Μακεδονίας (νομοί Πέλλας, Ημαθίας, Πιερίας, Θεσ/νίκης και Σερρών) σε καλλιέργειες κυρίως ροδακινιάς αλλά και καπνού, της Δυτικής Ελλάδας και κυρίως στην Αιτωλοακαρνανία για της αντιμετώπιση της αφίδας σε καλλιέργειες καπνού και της Κρήτης (νομός Λασιθίου) σε θερμοκήπια. Από το 2004 και έως το 2006, η χρήση του pymetrozine άλλαξε ιδιαίτερα γεωγραφική κατανομή. Έτσι περισσότερο χρησιμοποιήθηκε στη Μακεδονία για την αντιμετώπιση της αφίδας σε καλλιέργειες ροδακινιάς, στην Ηλεία και τη Μεσσηνία σε καλλιέργειες καρπουζιού και σε θερμοκήπια αλλά και στην Κρήτη (νομοί Ρεθύμνου, Λασιθίου και Ηρακλείου) για την αντιμετώπιση αλευρωδών κυρίως αλλά και αφίδων σε θερμοκήπια (προσωπική επικοινωνία με Παραγυιού Σταύρο, product manager της Syngenta Hellas).

### 8.1. Επίδραση του pymetrozine στην επιβίωση της *M. persicae*

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι οι κλώνοι της *M. persicae* που μελετήθηκαν έχουν πολύ χαμηλές τιμές συντελεστή ανθεκτικότητας που κυμαίνονται από το 1 έως το 3,38 ώστε να θεωρούμε ότι δεν έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδυαστεί με τη χαμηλή γενικότερα χρήση του pymetrozine καθώς ως κύρια αφιδοκτόνα σήμερα χρησιμοποιούνται τα νεονικοτινοειδή τα οποία έχουν πιο άμεσα και ορατά αποτελέσματα σε σχέση με το pymetrozine και επιπλέον μετά το σπάσιμο της πατέντας είναι περισσότερο προσεγγίσιμα οικονομικά.

Οι τιμές της LD<sub>50</sub> κυμάνθηκαν από 3,60 έως 12,19 mg/lit. Παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές της LD<sub>50</sub> σε κλώνους που προέρχονται από την Κεντρική Ελλάδα (Καρδίτσα, Λεχώνια) με τιμή κατά μέσο όρο της LD<sub>50</sub> 10,12 mg/lit ενώ ακολουθούν οι περιοχές της Βόρειας Ελλάδας (Κατερίνη, Κοζάνη, Μελίκη) με τιμή 7,65mg/lit, και της Νότιας Ελλάδας (Ναύπλιο) με τιμή 6,15mg/lit. Ο κλώνος από τη Χιλή έδειξε τιμή 7,87mg/lit. Σημειώθηκαν επίσης υψηλότερες τιμές κατά μέσο όρο της LD<sub>50</sub> στους κλώνους που προήλθαν από καλλιέργειες καπνού (9,69mg/lit) καθιστώντας τους πιο ανθεκτικούς σε σύγκριση με αυτούς που προήλθαν από ροδακινιά (6,59mg/lit). Το

γεγονός ό,τι παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε κλώνους που κατά της εποχή συλλογής τους προέρχονταν από περιοχές που δε χρησιμοποιήθηκε το pymetrozine (Καρδίτσα) ίσως έχει τη βάση του στα χαρακτηριστικά του βιολογικού κύκλου της αφίδας καθώς στην Ελλάδα υπάρχει έντονη παραλλακτικότητα του βιολογικού κύκλου της αφίδας ανά περιοχή. Οι κλώνοι από τις περιοχές που είχαν καλλιέργειες καπνού ήταν στην πλειοψηφία τους ανολοκυκλικοί, άρα καθώς δεν υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα είναι δυνατόν να γίνεται πιο γρήγορη επιλογή για τους πιο ανθεκτικούς κλώνους, κάτι που θα συμβεί με πιο αργό ρυθμό σε περιοχές που ο γενετικός ανασυνδυασμός που οφείλεται στη σεξουαλική αναπαραγωγή επηρεάζει τη συχνότητα των αλληλομόρφων όπως στις περιοχές που καλλιεργούνται ροδακινιές κυρίως.

Σε κλώνους από την Αγγλία σε αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εκεί (Foster S.P. et al., 2002) οι αντίστοιχες τιμές του LD<sub>50</sub> κυμαίνονταν από 420 έως 2812 μg/lit (0,42-2,812 mg/lit) ενώ σε μια άλλη έρευνα η αντίστοιχη τιμή κατά μέσο όρο ήταν 0,3 mg/lit δραστικής ουσίας (Wyss & Bolsinger, 1997).

Εφόσον παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της LD<sub>50</sub> της μέτρησης στις 168 ώρες με τις αντίστοιχες στις 96 ώρες, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, η έκθεση στο pymetrozine επηρέασε την ικανότητα επιβίωσης για άλλες 72 ώρες, των νυμφών που κατάφεραν να επιβιώσουν στις πρώτες 96 ώρες. Το γεγονός αυτό πιθανώς να σχετίζεται με την πρόκληση κάποιας μόνιμης βλάβης στη διαδικασία διατροφής των αφίδων. Πρέπει να σημειωθεί ότι το θρεπτικό stress μείωσε την ικανότητα της αφίδας *Aphis fabae* να διατραφεί όταν επέστρεψε σε καλής ποιότητας ξενιστή μετά από την υποβολή της σε καθεστώς πείνας (Leather et al., 1983) ενώ δεν είχε καμία επίπτωση στην περίπτωση της αφίδας *Metopolophium dirhordum* (Grüber & Dixon, 1987). Μελέτη σε μεγαλύτερους πληθυσμούς θα μπορούσε να δώσει περισσότερα στοιχεία για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης.

## 8.2. Επίδραση του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα της *M. persicae*

Η επίδραση του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα των ατόμων της *M.persicae* που επιβίωσαν της μεταχείρισης με τη μέση θανατηφόρα δόση του pymetrozine, μελετήθηκε με τον υπολογισμό του ενδογενή ρυθμού αύξησης του πληθυσμού  $r_m$ .

Η σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στον ενδογενή ρυθμό αύξησης ανάμεσα στα άτομα που δε δέχθηκαν καμία μεταχείριση (κατά μέσο όρο μεταξύ όλων των κλώνων  $r_m = 0,273$ ) και σε αυτά που επιβίωσαν της μεταχείρισης με τη δόση του pymetrozine που αντιστοιχούσε στο LD<sub>50</sub> του κάθε κλώνου (κατά μέσο όρο μεταξύ όλων των κλώνων  $r_m = 0,23$ ) δείχνει μια επίδραση της δραστικής ουσίας στο αναπαραγωγικό δυναμικό. Παράλληλα ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ενηλικίωση των ατόμων που είχαν δεχθεί επέμβαση με pymetrozine ήταν σημαντικά μεγαλύτερος (κατά μέσο όρο μεταξύ όλων των κλώνων 12 ημέρες) από τον αντίστοιχο χρόνο για τα άτομα που δε δέχθηκαν την επέμβαση (κατά μέσο όρο μεταξύ όλων των κλώνων 9,6 ημέρες) γεγονός που δείχνει την επίδραση του pymetrozine στο χρόνο που απαιτείται για την ενηλικίωση των ατόμων.

Η επίδραση αυτή του pymetrozine στο αναπαραγωγικό δυναμικό αλλά και στο χρόνο ενηλικίωσης των αφίδων πιθανώς να συνδέεται με την επίδραση στην θρεπτική κατάσταση του εντόμου και στο σωματικό του βάρος, καθώς η γονιμότητα των αφίδων αλλά και ο χρόνος ενηλικίωσής τους συνδέεται με το μέγεθός τους (Dixon, 1987). Μια αφίδα που έχει καταφέρει να φτάσει ένα υψηλό επίπεδο ανάπτυξης μέχρι την ενηλικίωσή της είναι πιθανό να μπορεί να διατηρήσει ένα υψηλό αναπαραγωγικό ποσοστό (Leather & Dixon, 1984, Dixon, 1987, Traicevski & Ward, 2002). Περίοδοι πείνας ή κακής ποιότητας διατροφής επηρεάζουν την επακόλουθη ανάπτυξη και αναπαραγωγική ικανότητα της αφίδας (Dixon, 1977, Leather et al., 1983). Άτομα της *M. persicae* δε μπορούν να ανταπεξέλθουν της πτωχής θρέψης στην νυμφική ηλικία τους (van Emden, 1977) ενώ άτομα τετάρτου σταδίου της αφίδας *Megoura viciae* τα οποία υποβλήθηκαν σε καθεστώς πείνας στο μπορεί να ολοκληρώσαν την ανάπτυξη τους αλλά έχασαν βάρος και εφόσον αφέθηκαν να τραφούν όταν ενηλικιώθηκαν επέδειξαν καθυστέρηση στην έναρξη της αναπαραγωγής τους (Brough & Dixon, 1990). Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και σε άτομα της αφίδας *Metopolophium dirhodum* όπου ενώ οι αφίδες κατάφεραν να ανακάμψουν της φτωχής ανάπτυξης στη νυμφική ζωή τους με αυξημένη ανάπτυξη στην ενήλικη ζωή τους όταν τράφηκαν σε καλής ποιότητας φυτά, παρήγαγαν όμως συνολικά μικρότερο αριθμό απογόνων (Gruber & Dixon, 1987). Η παραπάνω υπόθεση, της επίδρασης δηλαδή του pymetrozine στην αναπαραγωγική ικανότητα της *M. persicae*, θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτη της επίδρασης του pymetrozine σε άλλα χαρακτηριστικά του εντόμου όπως το σωματικό βάρος.



Σήμερα ως κύρια αφιδοκτόνα χρησιμοποιούνται τα νεονικοτινοειδή τα οποία έχουν αντικαταστήσει σχεδόν στο σύνολό τους τα παλαιότερα οργανοφωσφορικά και καρβαμικά. Τα νεονικοτινοειδή έχουν τοξική δράση με αποτέλεσμα τα αποτελέσματα να είναι άμεσα ορατά και να προσδίδουν στον παραγωγό το αίσθημα της ασφάλειας της προστασίας της καλλιέργειας του από τις αφίδες, σε αντίθεση με το pymetrozine όπου η αποτελεσματικότητά του γίνεται αντιληπτή μετά το πέρας τριών με τεσσάρων ημερών. Τα νεονικοτινοειδή δρουν στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης μιμούμενα τη δράση της στη μετασυναπτική νευρική μεμβράνη. Δε σχετίζεται ο τρόπος δράσης τους με αυτούς των άλλων χημικών οικογενειών και επομένως οι τρεις μηχανισμοί ανθεκτικότητας που αναπτύχθηκαν στις προηγούμενες χρησιμοποιούμενες ομάδες δεν επηρεάζουν τα νεονικοτινοειδή (Foster et al., 2003). Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί ανάπτυξη ανθεκτικότητας των αφίδων στα νεονικοτινοειδή, παρά την αναφορά για ανάπτυξη χαμηλής ανοχής στο imidacloprid (Foster et al., 2003, Margaritopoulos et al., 2007). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το χαμηλό πλέον κόστος διάθεσης των νεονικοτινοειδών (μετά τη λήξη της χρησιμότητάς από τις εταιρείες παραγωγής των σκευασμάτων) τα καθιστούν ιδιαίτερα προτιμητέα από τους παραγωγούς.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας όμως στα νεονικοτινοειδή άλλων ειδών εντόμων, όπως του αλευρώδη *Bemisia tabaci* (Rauch & Nauen, 2003), καθώς και η εντατική χρήση τους, άρα και η αυξημένη πίεση επιλογής, δεν αφήνουν περιθώρια επανάπαυσης. Ένα από τα μέσα ελέγχου της ανάπτυξης ανθεκτικότητας είναι η συνδυαστική χρήση χημικών διαφορετικού τρόπου δράσης ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Το pymetrozine, με τον ιδιαίτερο και μοναδικό τρόπο δράσης, μπορεί να συνδυάζεται με ασφάλεια με αντιπροσώπους άλλων χημικών ομάδων, όπως τα νεονικοτινοειδή για την πρόληψη εμφάνισης ανθεκτικότητας. Το γεγονός παράλληλα ότι λόγω του εξειδικευμένου τρόπου δράσης δεν αποτελεί κίνδυνο για έντομα με διαφορετικά στοματικά μόρια, όπως η πλειοψηφία των φυσικών εχθρών, αποτελεί άριστο μέσο ελέγχου σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εχθρών καλλιεργειών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anstead, J.A., Williamson, M.S., Eleftherianos, I.G., Denholm, I. (2004)** Highthroughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 871-877.
- Auclair, J.L. (1963)** Aphid Feeding and Nutrition *Annual Review of Entomology* **8**, 439-490
- Ausborn, J., Wolf, H., Mader, W. and Kayser H. (2005)** The insecticide pymetrozine selectively affects chordotonal mechanoreceptors *The Journal of Experimental Biology* **208**, 4451-4466
- Bedford ID, Kelly A, Banks GK, Fuog D, Markham PG. 1998.** The effect of Pymetrozine, in preventing transmission of cauliflower mosaic caulimovirus by the aphid species *Myzus persicae* (Sulzer). *Annals of Applied Biology* **132**, 453–462.
- Bextine, B.R., Harshman D., Johnson M.C. and Miller T.A. (2004)** Impact of pymetrozine on glassy-winged sharpshooter feeding behavior and rate of *Xylella fastidiosa* transmission. *Journal of Insect Science* **34** (4), 1-6
- Blackman R.L. & Eastop V.F. (1984)** *Aphids of the World's Crops: An Identification Guide*. John Willey Sons Publications, London.
- Blackman, R.L (1974)** Life-cycle variation of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research* **63**, 595-607
- Blackman, R.L. (1971)** Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research* **60**, 533-546
- Blackman, R.L., Malarky, G., Margaritopoulos J.T. and Tsitsipis J.A. (2007)** Distribution of common genotypes of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece, in relation to life cycle and host plant. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 253-263
- Blackman, R.L., Spence JM, Field LM, Devonshire AL. (1995)** Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Heredity* **75**, 297-302

- Blackman, R.L., Spence JM, Field LM, Devonshire AL. (1999)** Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity* **82**, 180-196
- Blackman, R.L., Spence JM, Field LM, Javed N, Devine GJ, Devonshire AL. (1996)** Inheritance of the amplified esterase genes responsible for insecticide resistance in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Heredity* **77**, 154-167
- Bolsinger, M., Cahill, M., Rollet, H. and Denholm, I. (1995)** Challenges with monitoring for insecticide resistance to novel chemicals – Exemplified by Pymetrozine. ACS Spec. Conf. VI, Molecular Genetics and Ecology of Pesticide Resistance, 18 – 23/6/95, Montana USA, 7pp
- Bonnemaison, L. (1951)** Contribution a l'étude des facteurs provoquant l'apparition des formes ailées et sexuées chez les Aphidinae. *Ann. I.N.R.A. [C] Ann. Epiphyties* **2** 1-380
- Brough C.N. & Dixon F.G. (1990)** The effects of starvation on development and reproductive potential of apterous virginoparae of vetch aphid, *Megoura viciae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **55**, 41-45
- Cassanelli, S., Cerchiari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni, E., Manicardi, G.C. (2005)** Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and kdr insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science* **61**, 91-96.
- Catterall, W.A. (2000)** From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25
- Chen, M., Han, Z., Qiao, X., Qu, M. (2007)** Resistance mechanisms and associated mutations in acetylcholinesterase genes in *Sitobion avenae* (Fabricius). *Pesticide biochemistry and Physiology* **87**, 189-195
- Chiang, F.M. & Sun, C.N. (1993)** Glutathione-S-transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **45**, 7-14
- Clark, A.G. & Shamaan, N.A. (1984)** Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is glutathione-S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**, 249-261
- Colletier, J.P., Fournier D., Greenblatt H.M., Stojan J., Sussman J.L., Zaccai G., Silman I. and Weik M. (2006)** Structural insights into substrate traffic and inhibition

in acetylcholinesterase *European Molecular Biology Organization Journal* **25**, 2746-2756

**Cox, D., Denholm, I. and Devonshire, A. (2004)** Monitoring of insecticide resistance in *Myzus persicae* from Greece, in *Aphids in a New Millenium*, ed. by Simon J-C, Dedryver C.A., Rispe C. and Hulle M. INRA Editions, Paris, France, pp 275-280

**Devi, P.B. & Singh, T.K. (2007)** Studies on the morphometry of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) *Entomological Research* **37**, 81-85

**Devonshire, A.L. & Moores, G.D. (1982)** A carboxylesterase with broad substrate-specificity causes organo-phosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **18**, 235-246

**Devonshire, A.L. (1987)** Resistance of Aphids to Insecticides. In *Aphids Their Biology, Natural Enemies and Control* Vol 2C Edited by Minks A.K. & Harrewijn Elsevier, Amsterdam P.H. pp123-139

**Devonshire, A.L. Field, L.M.; Foster, S.P.; Moores, G.D.; Williamson, M.S.; Blackman, R.L. (1998)** The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **353**, 1677-1684

**Devonshire, A.L., Foster, G.N., Sawicki, R.M. (1977)** Peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), resistant to organophosphorus and carbamate insecticides on potatoes in Scotland. *Plant Pathology* **26** 60-62.

**Devonshire, A.L., Moores, G.D. & Chiang, C. (1983)** The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. In Miyamoto J, Kearny P.C., eds *IUPAC pesticide chemistry: Human welfare and the environment*. New York: Pergamon Press 191-196

**Devonshire, A.L., Moores, G.D. & ffrench-Constant, R.H. (1986)** Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross-reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Shrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **76**, 97-107

**Dewar, A.M., Haylock, L.A., Chapman, J., Devine, G., Harling, Z. and Devonshire, A.L. et al. (1994)** Effect of triazamate on resistant *Myzus persicae* on sugar beet under field cages. In *Brighton Crop Protection Conference: Pest and diseases*, pp 407-412 Bracknell, UK:BCPC

- Dixon A.F.G. (1987)** Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in Aphids. In *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Edited by Minks A.K. & Harrewijn P. Elsevier, Amsterdam. Volume 2A. Pp269-288
- Eleftherianos, I.G., Foster, S.P. Williamson, M.S., Denholm, I. (2002)** Behavioral consequences of pyrethroid resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *The BCPC Conference: Pests and diseases, Volumes 1 and 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November 2002*: 745-748
- Enayati, A.A., Ranson H. and Hemingway J. (2005)** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* **14** (1), 3-8
- Fenton, L.M., Malloch, G., Woodford, J.A.T., Foster, S.P., Anstead, J., Denholm, I. King, L. and Pickup, J. (2005)** The attack of the clones : tracking the movement of insecticide resistant peach potato aphids *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **95**, 483-494
- ffrench-Constant, R.H. (2006)** Which came first: insecticides or resistance? *Trends in Genetics* **23** (1), 1-4
- ffrench-Constant, R.H., Daborn P.J. and Le Goff G. (2004)** The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics* **20** (3), 163-170
- ffrench-Constant, R.H., Devonshire, A.L. & White, R.P. (1988)** Spontaneous loss and reselection of resistance in extremely resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **30**, 1-10
- Field L.M. & Foster, S.P. (2002)** Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) *Pest Management Science* **58**, 889-894
- Field L.M. and Blackman R.L. (2003)** Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 107-113
- Field L.M., Lyko, F., Mandrioli, M. and Prantero G. (2004)** DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology* **13** (2), 109-115
- Field, L.M. & Devonshire, A.L. (1997)** Structure and organisation of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* **322**, 867-871

- Field, L.M. & Devonshire, A.L. (1998)** Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochemical Journal* **330**, 169-173
- Field, L.M. (2000)** Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* **349**, 863–868.
- Field, L.M., Anderson, A.P., Denholm, I., Foster, S.P., Harling, Z.K., Javed, N., Martinez-Torres, D., Moores, G.D., Williamson, M.S., Devonshire, A.L. (1997)** Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Science* **51**, 283-289
- Field, L.M., Blackman RL, Tyler-Smith C, Devonshire AL. (1999)** Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* **339** 737-742
- Field, L.M., Devonshire AL, ffrench-Constant RH, Forde BG. (1989a)** Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.) *FEBS Letters* **243**, 323-327
- Field, L.M., Devonshire AL, ffrench-Constant RH, Forde BG. (1989b)** The combined use of immunoassay and a DNA diagnostic technique to identify insecticide resistant genotypes in the peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **34**, 174-178
- Field, L.M., Devonshire, A.L. & Tyler-Smith, C. (1996)** Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* **313**, 543-547
- Field, L.M., Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL. (1993)** Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal* **294**, 569-574
- Fluckiger, C. R., Kristinsson, H., Senn, R., Rindlischbacher, A., Buholzer, H. & Voss, G. (1992)** CGA 215, 944 - A novel agent to control aphids and whiteflies. *Brighton Crop Prot. Conf. - Pests and Diseases*, **1**, 43-50.
- Forbes, A.R. (1977)** The mouthparts and feeding mechanism of aphids. In *Aphids as virus vectors*. Edited by Harris K.F. & Maramorosch K. Academic Press.London 83-104
- Foster S.P., Denholm, I., Thompson, R. (2002)** Bioassay and field simulator studies of the efficacy of pymetrozine against peach potato aphids, *Myzus persicae*

- (Hemiptera: Aphididae), processing different mechanisms of insecticide resistance. *Pest Management Science* **58**, 805-810
- Foster S.P., Young, S., Williamson, M.S., Duce, I., Denholm, I., Devine, G.J. (2003b)** Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* **91**, 98-106
- Foster, S.P., Denholm, I., Devonshire, A.L. (2000)** The ups and downs of insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. *Crop Protection* **19**, 873-879.
- Foster, S.P., Denholm, I., Thompson, R. (2003)** Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* **59**, 166-173.
- Foster, S.P., Harrington, R., Dewar, A.M., Denholm, I., Devonshire, A.L. (2002)** Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* **58**, 895-907
- Fournier, D & Mutero, A. (1994)** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology C* **108**, 19-31
- Georgiou, G.P. (1994)** Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* **75**, 51-59.
- Georgiou & Lagunes-Tejeda, (1991)** The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods, p. 318. FAO of the United Nations. Rome.
- Georgiou, G.P. (1986)** In *Pesticide Resistance : Strategies and Tactics. for Management* National Academy Press pp 14-43
- Gonzales-Valero, J. (1993)** Adsorption/desorption of CGA 215944 with various soil types. *Product safety, Ciba-Geigy AG, Basel (CH), Project report 3/93* 49p
- Goundoudaki, S. Tsitsipis, J.A., Margaritopoulos, J.T., Zarpas K.D. and Divanidis S. (2003)** Performance of the tobacco aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on Oriental and Virginia tobacco varieties. *Agricultural and Forest Entomology* **5**, 285-291
- Grant, D.F. & Hammock, B.D. (1992)** Genetic and molecular evidence for trans-acting regulatory locus controlling glutathione-S transferase-2 expression in *Aedes aegyptii*. *Molecular and General Genetics* **234**, 169-176
- Grüber K. & Dixon F.G. (1987)** The effect of nutrient stress on development and reproduction in an aphid. *Entomologia experimentalis et applicata* **47**, 23-30

- Guillemaud, T., Brun, A., Anthony, N., Sauge, M.H., Boll, R., Delorme, R., Fournier, D., Lapchin, L., Vanlerberghe-Masutti, F. (2003):** Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 289-297.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974)** Glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-7139
- Harrewijn, P. (1997)** Pymetrozine, a Fast-Acting and Selective Inhibitor of Aphid Feeding. *In-situ* Studies with Electronic Monitoring of Feeding Behaviour. *Pesticide Science* **49**, 130-140
- Hayes, J.D. and Wolf, C.R. (1988)** Role of glutathione transferase in drug resistance. In *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H. and Ketterer, B., eds), pp. 315–355. Academic Press Ltd, London.
- Heie, O.E. (1980)** The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark II. The Family Drepanosiphidae. Scandinavian Science Press, Klampenborg
- Hick, C.A., Field, L.M. & Devonshire, A.L. (1996)** Changes in the methylation of amplified esterase DNA during loss and reselection of insecticide resistance in peach potato aphids, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 41-47
- Hille Riss Lambers, D. (1966)** Polymorphism in Aphididae *Annual Review of Entomology* **11**, 47-78
- Huang, H.S., Hu, N.T., Yao, Y.E., Wu, C.Y., Chiang, S.W. and Sun, C.N. (1998)** Molecular cloning and heterologous expression of glutathione S- transferase involved in insecticide resistance from the diamond moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 651-658
- Hughes, P.B. and Raftos D.A. (1985)** Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research* **75**, 535–544
- Kaufmann, L., Schurmann F., Yiallourous M., Harrewijn P., Kayser H. (2004)** The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on a locust (*Locusta migratoria*) and an aphid (*Myzus persicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **138**, 469-483



- Kellenberg, S., West, J.W., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1997b)** Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of a brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *Journal of General Physiology* **109**, 589-605
- Kennedy, J.S. (1958)** Physiological condition on the host plant and susceptibility to aphid attack. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1**, 50-65
- Kennedy, J.S. & Booth, C.O. (1951)** Host alternation in *Aphis fabae* Scop I. Feeding preferences and fecundity in relation to the age and kind of leaves. *Ann Appl. Biol.*, **38**, 25-64
- Kennedy, J.S. & Stroyan, H.L.G. (1959)** Biology of aphids. *Annual Review of Entomology* **4**, 139-160
- Kephalogianni, T.E., Tsitsipis, J.A., Margaritopoulos, J.T., Zintzaras, E., Delon, R., Blanco Martin, I. and Schwaer, W. (2002)** Variation in life cycle and morphology of the tobacco host-race of *Myzus persicae* (Hemiptera :Aphididae) in relation to its geographical distribution. *Bulletin of Entomological Research* **92**, 301-307
- Kono Y. & Tomita T. (2006)** Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in *Ace*-paralogous acetylcholinesterase. *Pesticide Biochemistry & Physiology* **85** 123-132
- Leather S.R. & Dixon F.G. (1984)** Aphid growth and reproductive rate. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **35**, 137-140
- Lilly, M., Kreber, R., Ganetsky, B. and Carlson, J.R. (1994)** Evidence that the drosophilla olfactory mutant smellblind defines a novel class of sodium channel mutation. *Genetics* **136**, 1087-1096
- Little, E.I., Walker, C.H. and McCaffery. A.R. (1988)** A comparison of the pharmacokinetics of 14-C-trans-cypermethrin in a resistant and a susceptible strain of *Heliothis virescens* Brighton Crop Prot. Conf. 1988, vol **1**, 427-432
- Mallet, J. (1989)** The Evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Tree* **4**, 336-340
- Margaritopoulos, J., Tsitsipis J.A., Goudoudaki S. and Blackman R.L. (2002)** Life cycle variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece *Bulletin of Entomological Research* **92**, 309-319
- Margaritopoulos, J.T. Tsitsipis J.A., Zintzaras E. and Blackman R.L. (2000)** Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera :Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 233-244

- Margaritopoulos, J.T., Skouras, P.J., Nikolaidou, P., Manolikaki, J., Maritsa, K., Kiveli Tsamandani, Kanavaki, O.M., Bacandritsos, N., Zarpas K.D. and Tsitsipis, J.A. (2007)** Insecticide resistance status of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from peach and tobacco in mainland Greece. *Pest Management Science* **63**, 821-829
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge', J.B., Pasteur, N., Pauron, D., (1999a)** Voltage dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pesticide Science* **55**, 1012-1020
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. (1999b)** A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroids insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphididae) *Insect Molecular Biology* **8** (3), 339-346
- McPhee, J.C., Ragsdale, D.S., Scheuer, T. and Catterall, W. (1995)** A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel  $\alpha$  subunit in fast activation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12025-12034
- Moore G.D., Devine, G.J., Devonshire, A.L. (1994b)** Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. In *Brighton Crop Protection Conference: Pest and diseases*, pp 413-418 Bracknell, UK:BCPC
- Moore, G.D., Devine, G.J., Devonshire, A.L. (1994)** Insecticide insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **49**, 114-120.
- Mowry T.M., 2005** Insecticidal reduction of *Potato leafroll virus* transmission by *Myzus persicae*. *Annals of Applied Biology* **146**, 81-88
- Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T., Kono, Y. (2003)** An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**, 15-22
- Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D.W. Yoshiaki Kono, Y. and Takashi Tomita T. (2004)** An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 794-801
- Newcomb, R.D. Cambell, P.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (1997)** cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in

organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 15–25

**Nikolakakis, N.N., Margaritopoulos, J.T. and Tsitsipis, J.A. (2003)** Performance of *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae) clones on different host-plants and their host preference. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 235-242.

**O'Reilly, A.O., Khambay, B.P.S., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A. and Davies T.G.E. (2006)** Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal* **396**, 255-263

**Ono M, Swanson JJ, Field LM, Devonshire AL, Siegfried BD. 1999 (1999)** Amplification and methylation of an esterase gene associated with insecticide-resistance in greenbugs, *Schizaphis graminum* (Rondani) (Homoptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 1065-1073

**Oppenoorth, F.J. and van Asperen, K. (1960)** Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* **132**, 298–299

**Oppenoorth, F.J., Van der Pas, L.J.T. and Houx, N.W.H. (1979)** Glutathione-S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **11**, 176-188

**Pirone, T.P. & Perry, K.L. (2002)** Aphids: non persistent transmission. *Advances in Botanical Research* **36** 1-19

**Plapp, F.W. (1984)** The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: evidence that a single locus plays a major role in metabolic resistance to insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22** 194-201

**Powell, G. (2005)** Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non persistently transmitted viruses. *Journal of General Virology* **86**, 469-472

**Powell, G., Tosh, C.R. and Hardie, J. et al. (2006)** Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology* **51**, 309-330.

**Prapanthadara, L., Hemingway, J. and Ketterman, A.J. (1993)** Partial purification and characterization of Glutathione-S-transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **47**, 119-133

- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H. and Hemingway, J. (2001)** Identification of a novel class of insect glutathione-S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* **2**, 25-32
- Rauch N and Nauen R, (2003).** Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch Insect Biochem Physiol* **54**:165–176
- Raymond, M. Gallagher, A., Fort, P. and Pasteur N. (1991)** Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* **350**, 151-153
- Remaudiere, G. & Remaudiere, M. (1997)** Catalogue des Aphididae du Monde, Homoptera Aphidoidea. INRA, Paris
- Roush, R.T., Millar, G.I. (1986)** Considerations for the design of insecticide resistance monitoring programs. *Journal of Economic Entomology* **79**, 293- 298.
- Rouze-Jouan, J., Terradot, L., Pasquer, F., Tanguy S. and Giblot Ducray-Bourdin, D. (2001)** The passage of *Potato leafroll virus* through *Myzus persicae* gut membrane regulates transmission efficiency. *Journal of General Virology* **82**, 17-23
- Salinas, A.E. & Wong, M.G. (1999)** Glutathione-S-transferases – A review. *Current Medicinal Chemistry* **6**, 279-309
- Sechser B., Reber, B. and Bourgeois F. (2002)** Pymetrozine: Selectivity spectrum to beneficial arthropods and fitness for integrated pest management. *Journal of Pest Science* **75**, 72-77
- Singh, R.P. (1996)** Detection of stylet borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **59**, 189-196
- Smissaert, H.R. (1964)** Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphates. *Science* **143**, 129-131
- Spence JM, Blackman RL, Testa JM, Ready PD. (1998)** A 169bp tandem-repeat DNA marker for sub-telomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group. *Chromosome Research* **6**, 167-175
- Srivastava, P.N. (1987)** Nutritional Physiology. In *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Edited by Minks A.K. & Harrewijn P. Elsevier, Amsterdam. Pp 99-101

- Stoetzel, M.B. Miller, G.L., O'Brien, P.J. and Graves J.B. (1996)** Aphids (Homoptera: Aphididae) colonising cotton in the United States *Florida Entomologist* **79**, 193-205
- Sussman J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991)** Atomic structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica* : A Prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**, 872-879
- Tabashnik, B.E. & Croft, B.A. (1985)** Evolution of pesticide resistance in apple pests and their natural enemies. *Entomophaga* **30**, 37-49
- Tjallingii, W.F. (2006)** Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* **4**, 739-745
- Townsend, M.G. and Busvine J.R. (1969)** The mechanism of malathion resistance in the blowfly *Chrysomya putoria*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **12**, 243–267
- Traicevski V. & Ward S.A. (2002)** The effect of past and current hosts on reproductive investment by the adult cowpea aphid *Aphis craccivora*. *Ecological Entomology* **27**, 601-607
- Troncoso, A.J. Vargas, R.R., Tapia, D.H, Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H.M. (2005)** Host selection by the generalist aphid *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae) and its subspecies specialized on tobacco, after being reared on the same host. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 23-28
- Van Asperen, K and Oppenoorth F.J. (1959)** Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **2**, 48–57
- van Emden, H.F., Eastop, V.F., Hughes, R.D. and Way, M.J. (1969)** The Ecology of *Myzus Persicae* *Annual Review of Entomology* **14**, 197-270
- van Toor, R. & Teulon, D.A.J. (2005)** Towards an insecticide resistance management strategy to control aphid virus vectors in potatoes Potato aphid virus project– Final report 2002-05
- Vargas, R.R., Troncoso, A.J., Tapia, D.H, Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H.M. (2005)** Behavioural differences during host selection between alate virginoparae of generalist and tobacco-specialist *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **116**, 43-53
- Vassilev, P.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1989)** Inhibition of inactivation of single sodium channels by a side-directed antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 8147-8151

- Vassilev, P.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1988)** Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**, 1658-1661
- von Dohlen, C.D., Rowe, C.A. and Heie, O.E. (2006)** A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Aphididae) using DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**, 316-329
- Vontas, J.G., Small, G.J. & Hemingway, J (2001)** Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemistry Journal* **357**, 65-72
- Voss, G. & Matsamura, F. (1964)** Resistance to organophosphorous compound in the two spotted spider mite: two different mechanisms of resistance *Nature* **202**, 319-320
- Wang, S.Y. & Wang, G.K. (2003)** Voltage-gated channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cellular Signalling* **15**, 151-159
- Weber, G. (1986)** Ecological genetics of host plant exploitation in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **40**, 161-168
- Weber, G., (1985)** Genetic variability in host-plant adaptation of green peach aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**, 49-56
- WHO Expert Committee on Insecticides (1957).** 7th Report. In: WHO Tech. Rept. Ser. World Health Organization.
- Wyatt, I. J. & White, P. F. (1977)** Simple estimation of intrinsic increase rates for aphids and tetranychid mites. *Journal of Applied Ecology* **14**: 757-766.
- Wyss, P. & Bolsinger, M. (1997a)** Translocation of Pymetrozine in plants *Pesticide Science* **50**, 195-202
- Wyss, P. & Bolsinger, M. (1997b)** Plant-mediated effects on Pymetrozine efficacy against aphids *Pesticide Science* **50**, 203-210
- Zanum, T., Simon, J.C., Crochard, D., Ballanger, Y., Lapchin, L., Vanlerberghe-Masutti, F., Guillemaud, T. (2005)** Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach potato aphid *Myzus persicae* ? *Heredity* **94**, 630-639
- Zitter, T.A. (1977)** Epidemiology of Aphid-borne viruses. In *Aphids as virus vectors*. Edited by Harris K.F. & Maramorosch K. Academic Press.London pp.385-412